

**GENOMWEITE ANALYSE
ZUR IDENTIFIZIERUNG DIFFERENTIELL EXPRIMIERTER
MICRORNAs UND mRNAs
BEI MORBUS ALZHEIMER**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Dezember 2016

vorgelegt von

Dipl. – Biol. Sabrina Pichler

geboren am 23.10.1984 in Zweibrücken

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Riemenschneider



UKS

Universitätsklinikum des Saarlandes
und Medizinische Fakultät
der Universität des Saarlandes

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden in der Arbeitsgruppe von Prof.
Dr. med. Matthias Riemenschneider in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
im Fachbereich der Biowissenschaften durchgeführt.

Disputation am:

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Tobias Hartmann

Zweitgutachter:

Beisitzer:

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

DANKSAGUNG

Eine wissenschaftliche Arbeit wie diese, bedarf zahlreicher Unterstützung um zum Abschluss zu kommen, so dass ich an dieser Stelle die Gelegenheit wahrnehmen möchte, mich bei den Menschen zu bedanken, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. med. Riemenschneider für die Vergabe dieser interessanten Forschungsarbeit in seiner Arbeitsgruppe und das in mich gesetzte Vertrauen. Bedanken möchte ich mich zudem bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Hartmann und den Gutachtern.

Ein herzliches Dankeschön auch an Prof. Walter und Dr. rer. nat. Kostya Lepikhov für die spontane unkomplizierte Hilfe im Zuge des Mausexperiments. Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Petra Leidinger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Meese für die Durchführung der Febit miRNA-Arrays und bei Herrn Prof. Andreas Keller für die erste Auswertung bedanken. Vielen Dank auch an die Arbeitsgruppen von Prof. Dr. med. Fassbender (Klinik für Neurologie: Dr. med. Alex Liu, Andrea Schotteck), Prof. Dr. med. Vogt (Klinik für Dermatologie: Alexandra Stark), Prof. Dr. Zimmermann (Institut für Biochemie: Dr. rer. nat. Johanna Dudek), Prof. Dr. Schlenstedt (Institut für Biochemie: Dr. rer. nat. Ute Rothenbusch) und Prof. Dr. med. Schneider (Klinik für Innere Medizin II: Dr. rer. nat. Ellen Damm) für die Bereitstellung verschiedener Geräte und Techniken.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen für die angenehme, freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Mein herzlichster Dank gilt besonders Frau Dr. rer. nat. Daniela Hartl, Herrn Dr. rer. nat. Manuel Mayhaus und Herrn Dr. rer. nat. Gilles Gasparoni für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, konstruktive Kritik, sowie die stetige Unterstützung im Laboralltag. Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Wei Gu für seinen unermüdlichen Einsatz und seine Geduld bedanken, der mir das wissenschaftliche Leben mit seinen Bioinformatik- und Statistikkenntnissen um ein Vielfaches erleichtert hat. Katrin Rubly danke ich für die Unterstützung im Laboralltag besonders bei den Zellkultur- und Mausexperimenten und das immer offene Ohr während der letzten Jahre.

Vielen Dank auch an Christine Stahl, die immer zur rechten Zeit am rechten Ort war, wenn es mal wieder nicht so lief - insbesondere für das „Entfruster-Programm“ zu jeder Tages- und Nachtzeit sowie für den unaufhörlichen Schokoladen-Nachschub.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie - vor allem bei meiner Mama - und meinem zukünftigen Mann Christoph bedanken, die mich stets bedingungslos unterstützt haben. Danke für euer Verständnis und die endlose Geduld, die aufmunternden Worte und das Vertrauen in mich.

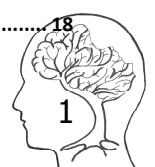
„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach der Zeit und den Umständen
das Möglichste getan hat.“

(Johann Wolfgang von Goethe, Italienische Reise 1787)

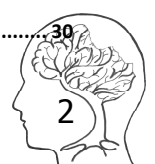


INHALTSVERZEICHNIS

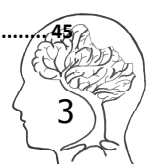
Danksagung	III
1. Einleitung	1
1.1. Demenzen.....	2
1.2. Morbus Alzheimer - Früher und Heute.....	3
1.2.1. Historisches - Auguste D. und Johann F.	3
1.2.2. Exklusdiagnose Morbus Alzheimer – heute	4
1.2.3. Therapiemöglichkeiten bei Morbus Alzheimer	7
1.2.4. Genetik	8
1.2.5. Epigenetik	9
1.2.5.1. MicroRNAs.....	10
1.3. Zielsetzung der Arbeit	12
2. Materialien.....	14
2.1. Chemikalien von A bis Z.....	14
2.2. Geräte.....	15
2.3. Verbrauchsmaterial und Zubehör	16
2.4. Internet Tools, Software und PC-Programme	16
2.5. Größenstandards in der Gelelektrophorese	17
2.6. Reaktionskits	17
2.6.1. Reaktionskits zur RNA- und Plasmid-Extraktion:.....	17
2.6.2. Reaktionskit zur Bestimmung des RIN-Wertes im Bioanalyzer (Agilent):	17
2.6.3. Mikroarrays und zugehörige Reaktionskits:.....	18
2.6.4. Reaktionskits zur Reverse Transkription und semiquantitativen real time PCR:	18
2.7. Oligonukleotide für die reverse Transkription und semiquantitative real time PCR	18
2.8. Enzyme und Antibiotika	18



2.9.	Lösungen und Puffer	19
2.9.1.	6xLadepuffer (eigene Herstellung) für die Gelelektrophorese:.....	19
2.9.2.	GelRed™ Ladepuffer Mix und GelRed™ Bad.....	19
2.9.3.	2xLysepuffer zur Extraktion von gDNA aus Mausschwanzbiopsien:.....	19
2.9.4.	Herstellung des Nukleotidmixes (25mM each) für PCR-Reaktionen (Solis BioDyne, Tartu, Estland):	19
2.9.5.	Agar und Lösungen für die Transformation:	20
2.10.	Humane Gehirngewebe.....	20
2.11.	Mauslinien und murine Gehirngewebe.....	23
2.11.1.	Wildtyp-Mäuse.....	23
2.11.2.	Triple-transgenes Alzheimer-Mausmodell (3xTg).....	23
2.11.3.	Gewebe aus APP23 und APP51 Mauslinien	23
2.12.	Zell-Linien in der Zellkultur	24
2.12.1.	HEK293T	24
2.12.2.	SH-SY5Y.....	24
2.13.	Bakterien für die Transformation	24
2.13.1.	One Shot TOP10 E.coli	24
2.14.	Plasmide	25
3.	Methoden	26
3.1.	Molekularbiologische Methoden.....	26
3.1.1.	Ribonukleinsäure-Extraktion aus Gehirngewebe und Zellpellets.....	26
3.1.2.	Extraktion genomischer DNA aus Mausschwanz.....	27
3.1.3.	Konzentrationsbestimmung und Qualitätsanalyse von Nukleinsäuren.....	28
3.1.3.1.	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	28
3.1.3.2.	Gelelektrophorese	28
3.1.3.3.	Bestimmung des RIN-Wertes (RNA Integrity Number) im Bioanalyzer.....	29
3.1.4.	Polymerase-Kettenreaktion	



3.1.5.	Genotypisierung 3xTg Mäuse für PSEN1 Mutation	31
3.1.5.1.	Amplifikation von PSEN1.....	31
3.1.5.2.	PSEN1 Restriktion	31
3.1.6.	Reverse Transkription.....	32
3.1.6.1.	High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.....	33
3.1.6.2.	TaqMan MicroRNA Reverse Transkription Kit	33
3.1.7.	Semiquantitative real time PCR (sqPCR)	33
3.1.8.	Genexpressionsanalyse auf Basis von Mikroarrays	36
3.1.8.1.	miRNA Expressionsanalyse mittels Febit Biochip	36
3.1.8.2.	mRNA Expressionsanalyse mittels Illumina HT12_v4 Beadchip	37
3.1.8.2.1.	Herstellung biotinylierter cRNA.....	37
3.1.8.2.2.	Illumina Sentrix Bead Array HT12v4	38
3.2.	Tierexperimentelle Arbeiten	39
3.2.1.	Haltung und Züchtung von Mauslinien	39
3.2.1.1.	Gewebepräparation	40
3.3.	Zellen und Bakterien	40
3.3.1.	Kultivierung und Passagieren von Zellen	40
3.3.2.	Zell-Ernte und Kryokonservierung.....	40
3.3.3.	Bestimmung der Zellzahl.....	41
3.3.4.	„Killing curve“ für Puromycin	41
3.3.5.	Hitzeschock-Transformation	41
3.3.6.	Plasmidisolation	42
3.3.7.	Transfektion humaner Zelllinien mit Lipofectamin2000.....	42
3.3.8.	Fluoreszenzmikroskopie transfizierter Zellen	43
3.4.	Bioinformatische Methoden zur in silico Analyse von miRNA-mRNA-Interaktionen.....	44
4.	Ergebnisse	45



4.1.	Analysen zur Expression von microRNAs in Morbus Alzheimer.....	46
4.1.1.	Genomweites microRNA Expressionsprofil im temporalen Kortex.....	46
4.1.2.	Validierung der genomweit signifikanten microRNAs	51
4.1.3.	Analyse zum zellulären Ursprung der Deregulation des miR-132/212 Clusters	51
4.1.4.	Expression neuronaler miRNAs im Verlauf der Erkrankung.....	52
4.2.	Analysen zur Genexpression in Morbus Alzheimer.....	54
4.3.	Analysen zur Identifikation potentieller miRNA-mRNA-Interaktionen	59
4.4.	Analysen in Maus- und Zellkulturmodellen für Morbus Alzheimer	63
4.5.	Manipulation des miR-132/212 Clusters in humanen Zell-Linien durch Transfektion	64
5.	Diskussion	LXVII
5.1.	miRNome in Morbus Alzheimer.....	LXVII
5.2.	miR-132/212 in AD.....	LXIX
5.3.	Deregulierte mRNAs in Morbus Alzheimer.....	LXX
5.4.	Korrelation zwischen miRNAs und mRNAs – validierte und vorhergesagte Zielgene	LXXI
6.	Zusammenfassung	LXXIV
7.	Summary.....	LXXV
8.	Literaturverzeichnis	LXXVI
9.	Anhang.....	LXXXII
	Abkürzungsverzeichnis.....	LXXXVIII
	Abbildungsverzeichnis	XC
	Tabellenverzeichnis	XCI
	Curriculum Vitae.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Eidesstattliche Erklärung.....	XCII



1. EINLEITUNG

Alterassozierte Erkrankungen, welche häufig mit erhöhten Gesundheits- und Pflegekosten einhergehen, rücken mit der stetig steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung verstärkt in den Vordergrund. Daten des Statistischen Bundesamtes Wiesbaden belegen, dass inzwischen nicht nur Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie Krankheiten des Verdauungs- und Atmungssystems zu den zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland zählen, sondern auch psychischen Erkrankungen und Krankheiten des Nervensystems (Abb. 1).



Abb. 1: Anzahl der Todesfälle 2013 nach Todesursachen in Deutschland gemäß ICD-10

Die Grafik basiert auf Daten, die den jährlichen Ausgaben zum Thema „Gesundheit - Todesursachen in Deutschland“ der Fachserie 12 Reihe 4 des Statistischen Bundesamtes Wiesbaden entnommen wurden. Insgesamt verstarben im Jahre 2013 in Deutschland 893.858 Personen.
Quelle 1: Grafik abgewandelt nach www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/GestorbeneAnzahl.html

Neurodegenerative Erkrankungen (griech.: neuro = Nerv, lat.: degenerare = entarten) des Nervensystems stelle eine Gruppe von meist langsam fortschreitenden Krankheiten dar, die vorwiegend im Alter zwischen 50 und 75 Jahren in Erscheinung treten. Sie entstehen hauptsächlich sporadisch und beruhen eher selten auf genetischen Veränderungen. Im Allgemeinen stellen toxische Aggregate aus fehlerhaft prozessierten Proteinen, die sich inner- und außerhalb von Nervenzellen anreichern, die Ursache für Fehlfunktionen und Verlust einzelner oder mehrerer Nervenzellpopulationen sowie der Verbindungen dar. Diese morphologischen und biochemischen Veränderungen erzeugen in Abhängigkeit von Lokalisation, Art und Ausprägung ein anderes klinisches Bild mit den für die jeweilige Erkrankung typischen kognitiven Defiziten und/oder Bewegungsstörungen. Zu den bekanntesten neurodegenerativen Erkrankungen zählen Systematrophien wie beispielsweise Parkinson, Chorea Huntington und Amyotrophe Lateralsklerose, aber auch Prionen-Erkrankungen (z.B. Creutzfeldt-Jakob-Krankheit) und Demenzen (z.B. Morbus Alzheimer) (Jellinger, 2005; Kurz, 2010).



1.1. Demenzen

Im Jahr 2013 waren entsprechend der Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) etwa 44,4 Millionen Menschen weltweit von einer Demenz betroffen, darunter mehr als 1,4 Millionen in Deutschland (Deutsche Alzheimer Gesellschaft). Ausgehend von den derzeitigen Zahlen rechnet man weltweit alle 20 Jahre mit einer Verdopplung der Erkrankungen. Der prozentuale Anteil der an einer Demenz Erkrankten ist altersabhängig und verdoppelt sich in einem Zeitraum von 5 Altersjahren. Die Prävalenzrate steigt von geschätzten 0,1 % bei den 45 – 65 Jährigen auf 0,4 % bei den 65 – 69 Jährigen und auf etwa 40 % bei den Hochbetagten (> 90 Jahre) an. Nach dem 8. Lebensjahrzehnt sind mehr Frauen (ca. 70 %), als Männer betroffen, was unter anderem der höheren Lebenserwartung der Frauen geschuldet ist. Eine Altersabhängigkeit ist auch bei der Anzahl an Neuerkrankungen (Inzidenz) zu beobachten, welche bei den über 90 Jährigen bei etwa 10 % liegt. In Deutschland erwartet man jährlich etwa 6.000 bei den unter 65 Jährigen und etwa 300.000 Neuerkrankungen bei den über 65 Jährigen (Abb. 2) (Bickel, 2009).

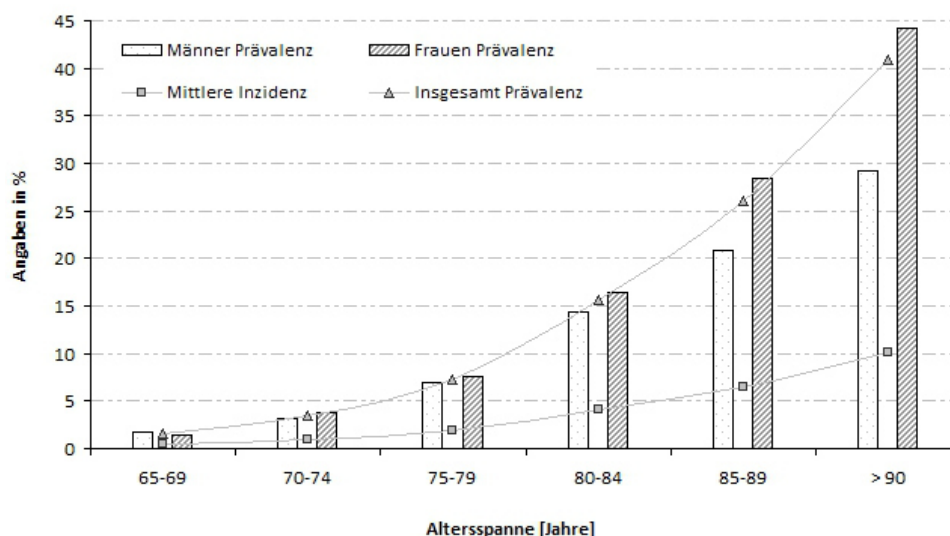


Abb. 2: Abhängigkeit von Prävalenz und Inzidenz von Alter und Geschlecht bei Demenz-Erkrankungen in Prozent

Die Grafik basiert auf gesammelten Daten aus dem europäischen Raum (EuroCoDe, Stand 2013).

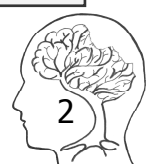
Quelle 2: Grafik erstellt nach Daten aus dem Infoblatt zur Verbreitung der Demenzen der Deutschen Alzheimer Gesellschaft („Das Wichtigste 1 - Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen“) www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/infoblatt1_haeufigkeit_demenzerkrankungen_dalg.pdf

Betroffene leiden insbesondere an der zunehmenden Einschränkung des Alltags durch fortschreitenden Verlust kognitiver Fähigkeiten wie beispielsweise Gedächtnis und Orientierung, sowie Persönlichkeitsveränderungen und Verminderung des Urteilsvermögens, welche für eine Demenz bezeichnend sind. Eine exakte Definition gemäss aktueller ICD-10-GM Klassifizierung („International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems“, German Modification, 10th edition) ist Box 1 zu entnehmen.

Box 1: Definition Demenz nach ICD-10-GM Klassifizierung (Version 2015)

Demenz (F00-F03) ist ein Syndrom als Folge einer meist chronischen oder fortschreitenden Krankheit des Gehirns mit Störung vieler höherer kortikaler Funktionen, einschließlich Gedächtnis, Denken, Orientierung, Auffassung, Rechnen, Lernfähigkeit, Sprache und Urteilsvermögen. Das Bewusstsein ist nicht getrübt. Die kognitiven Beeinträchtigungen werden gewöhnlich von Veränderungen der emotionalen Kontrolle, des Sozialverhaltens oder der Motivation begleitet, gelegentlich treten diese auch eher auf. Dieses Syndrom kommt bei Alzheimer-Krankheit, bei zerebrovaskulären Störungen und bei anderen Zustandsbildern vor, die primär oder sekundär das Gehirn betreffen.

Quelle 3: Text übernommen von www.dimdi.de



Insgesamt sind mehr als 50 verschiedene, selten reversible ($< 1\%$) Erkrankungsformen bekannt, die sich in primäre und sekundäre Demenzen unterteilen lassen.¹ Neurodegenerative (Alzheimer-Typ) und vaskuläre Demenzen (ehem.: Multiinfarkt-Demenz), sowie deren Mischformen zählen zu den am häufigsten vorkommenden primären Demenzen. Gedächtnisstörungen können aber auch im Rahmen anderer neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen auftreten (Tumore, Parkinson u.a.) oder gar internistische Ursachen haben, wie beispielsweise Infektionen, Alkoholismus, Medikamentenintoxikation und Stoffwechselerkrankungen. Von diesen sogenannten sekundären Demenzen sind jedoch weniger als 10 % aller an einer Demenz Erkrankten betroffen. Der Großteil, etwa Zweidrittel, leidet Statistiken zufolge an einer primären Demenz, Morbus Alzheimer (Abb. 3) ("2015 Alzheimer's disease facts and figures," 2015; Clarfield, 2003).

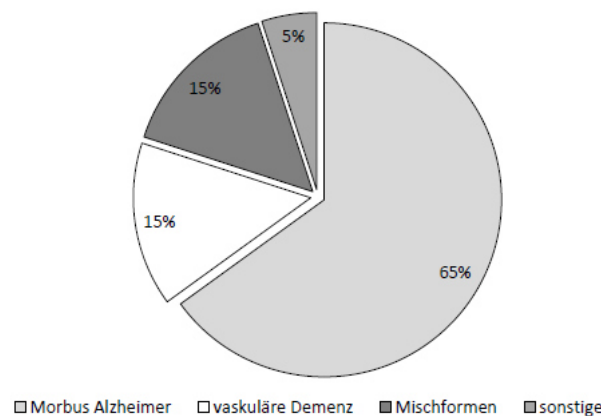


Abb. 3: Prozentuale Anteile der am häufigsten vorkommenden Demenzformen weltweit 2011

Zweidrittel aller Demenzerkrankten leiden laut Datenerhebung des Instituts für Bevölkerung und Entwicklung in Berlin an Morbus Alzheimer

Quelle 4: Grafik abgewandelt nach www.de.statista.com/statistik/daten/studie/180614/umfrage/formen-von-demenz/

1.2. Morbus Alzheimer - Früher und Heute

1.2.1. Historisches - Auguste D. und Johann F.

Alois Alzheimer (* 14.06.1864 – † 19.12.1915) stellte 1906 auf einer Versammlung Südwestdeutscher Irrenärzte in Tübingen den Fall Auguste Deter vor (Abb. 4).

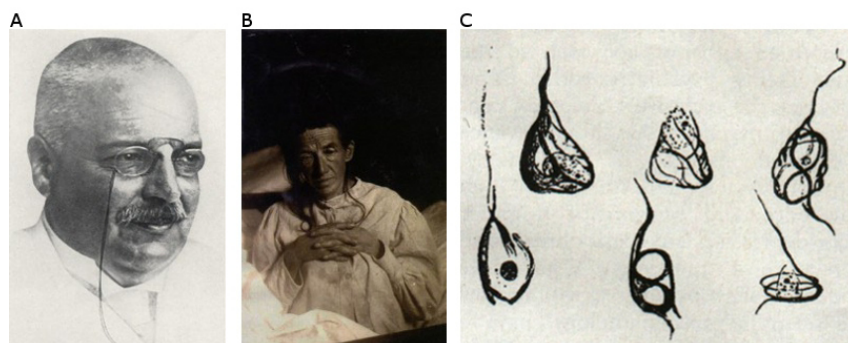


Abb. 4: Alois Alzheimer und Auguste Deter

Alois Alzheimer (A) und seine Patientin Auguste Deter (B) bei der Aufnahme in die Irrenanstalt Frankfurt am Main. (C) Eine anhand eines Gewebeschnittes aus Gehirngewebe seiner verstorbenen Patientin von Alois Alzheimer angefertigte Zeichnung veränderter Neurofibrillen

Quelle 5: Grafik entnommen aus www.neurophilosophy.wordpress.com/2006/11/03/100-years-of-alzheimers-disease/

¹ Siehe auch: www.wegweiser-demenz.de



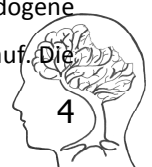
Neben zeitlicher und örtlicher Desorientierung beschrieb der Neuropathologe und Psychiater bei seiner 51-Jährigen Patientin auch Sprach- und Wortfindungsstörungen, eine stark zunehmende Gedächtnisschwäche, sowie Persönlichkeitsveränderungen und Halluzinationen. Da sich dieses von Alois Alzheimer beobachtete klinische Erkrankungsbild keiner zu diesem Zeitpunkt bekannten Krankheit zuordnen ließ, ergriff Alzheimer nach ihrem Tod im Alter von 55 Jahren, die Möglichkeit zur Untersuchung ihres Gehirns. Er protokollierte eine gleichmäßige Atrophie des Gehirns, die Einlagerung eines „eigenartigen Stoffes“, den Verlust von Ganglienzellen in den oberen Zellschichten der Hirnrinde, veränderte Neurofibrillen und die Bildung von Fibrillenaggregaten (Alzheimer, 1907). Ein weitaus weniger bekannter Patient (Johann F.) kam im Alter von 56 Jahren mit vergleichbaren Symptomen (Vergesslichkeit, Einschränkung des Alltags u.ä.) in die Klinik und verstarb 3 Jahre später. Bei der anschließenden Untersuchung seines Gehirns waren zwar keine Fibrillenaggregate zu beobachten, aber dennoch schien es sich um eine Subform der bei Auguste D. beobachteten neuen Erkrankung zu handeln (Klünemann et al., 2002; Möller & Graeber, 1998).

Emil Kraepelin war es der schließlich 1910 die noch heute offiziell gültige Bezeichnung „Alzheimer-Krankheit“ für die von Alois Alzheimer dokumentierte Erkrankung einführte. (Kraepelin, 1910) Entsprechend des damaligen Wissensstandes ging man bei auftretenden Demenzen mit einem Erkrankungsalter über 65 Jahre weiterhin von einer altersbedingten Arteriosklerose aus, so dass der Begriff zunächst nur für Demenzen mit einem früheren Krankheitsbeginn verwandt wurde. Erst Robert Katzmann veranlasste 1976 aufgrund ähnlicher pathologischer Befunde in wesentlich älteren Patienten und Familien eine Neudefinition, bei der senile Demenz und Alzheimer-Krankheit unter dem Namen Alzheimer-Krankheit (engl.: **Alzheimer's Disease**, kurz: **AD**) zusammengefasst wurden. (Katzman, 1976)

1.2.2. Exklusionsdiagnose Morbus Alzheimer – heute

Nch heutigem Kenntnisstand liegt der tatsächliche Erkrankungsbeginn bei der Alzheimer Krankheit in der Regel mehr als 15 Jahre vor dem Auftreten der ersten Symptome. Viele der charakteristischen biochemischen und morphologischen Veränderungen haben sich dann bereits manifestiert, wie beispielsweise eine mit der Erkrankung weiter fortschreitende Atrophie des Gehirns, vergrößerte Hirnventrikel und tiefe, verbreiterte Furchen. Die von Alois Alzheimer seinerzeit nicht näher definierte Veränderung der zu Aggregaten akkumulierten Neurofibrillen ist heute als Hyperphosphorylierung des Proteins Tau (p-Tau) bekannt. Die aus einem eigenartigen Stoff bestehende Einlagerung kennt man heute als Amyloid-Plaques die aus A β -Aggregaten (*sprich*: A β) bestehenden.

Amyloid-Plaques entstehen durch Aggregation von A β , das bei der Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) entsteht. Dabei handelt es sich um ein integrales Membranprotein, welches ubiquitär, insbesondere aber in Herz, Niere, Milz und Gehirn exprimiert wird. Mehrere alternative Spleißstellen ermöglichen die Bildung verschiedener Protein-Isoformen, wobei in neuronalem Gewebe hauptsächlich APP695 vorkommt (Zhang, Thompson, Zhang, & Xu, 2011). APP wird entweder durch eine Kombination aus α - (ADAM10 u.a.) und γ -Sekretasen in nicht-pathogene Fragmente (=> nicht-amyloidogene Proteolyse) oder durch eine Kombination aus β - (BACE1) und γ -Sekretase in A β -Peptide und andere Fragmente (=> amyloidogene Proteolyse) gespalten. Beide Prozessierungswege treten unter normalen physiologischen Bedingungen auf. Die



Entscheidung ob die APP-Prozessierung auf dem amyloidogenen oder nicht-amyloidogenen Weg erfolgt, ist noch nicht vollständig verstanden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass beispielsweise die Lipidzusammensetzung der Plasmamembran einen Einfluss auf die Prozessierung ausübt (Ehehalt, Keller, Haass, Thiele, & Simons, 2003).

Bei der enzymatischen Spaltung durch die γ -Sekretase - ein Multiproteinkomplex bestehend aus Presenilin (PSEN1, PSEN2), Nicastrin, Aph-1 (Aph1a, Aph1b) und Pen-2 - können Peptidketten von 36-43 Aminosäuren Länge ($A\beta$ 36-43) entstehen, wobei hauptsächlich $A\beta$ 40 und $A\beta$ 42 gebildet werden. Die Prozessierung von APP ist zur Übersicht in Abb. 5 graphisch dargestellt.

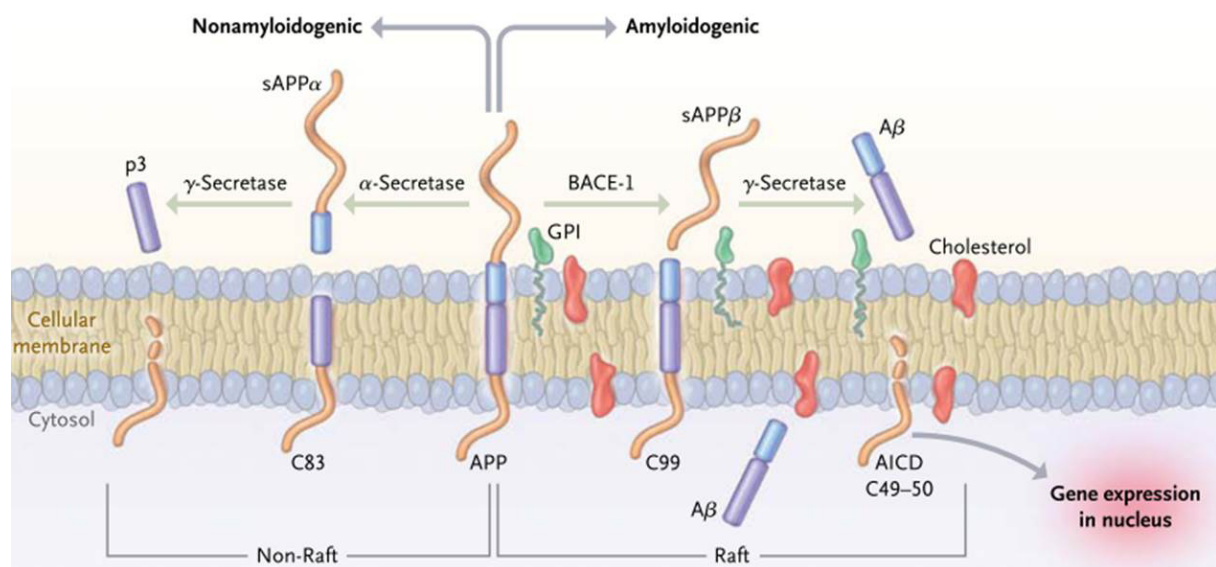


Abb. 5: Graphische Darstellung der APP-Prozessierung über den nicht-amyloidogenen und amyloidogenen Weg (Querfurth & LaFerla, 2010)

$A\beta$ 42 besitzt im Vergleich zu den anderen $A\beta$ -Formen eine höhere Tendenz Oligomere und Aggregate in Form der unlöslichen, charakteristischen Amyloid-Plaques zu bilden (Hubin, van Nuland, Broersen, & Pauwels, 2014). Unter normalen physiologischen Bedingungen erfolgt die APP-Prozessierung sowohl über den α - als auch den β -Sekretase-Weg. Neben der Bildung des Abeta-Peptids sorgen auch Abbauprozesse dafür, dass das Abeta-Peptid nicht über Maßen akkumuliert. Bei Morbus Alzheimer ist dieses Gleichgewicht aus Auf- und Abbau gestört (Hardy & Selkoe, 2002).

Das Amyloid beta Peptid gilt durch seine Tendenz zur Bildung unlöslicher Aggregate als zentrales Protein der Alzheimer Erkrankung. Entsprechende der bekannten Amyloid-Hypothese sind die Bildung und anschließende Aggregation des Amyloid beta Peptids zu Plaques, das Ereignis das neurotoxisch wirkt und degenerative Prozesse auslöst.

Tau (MAPT) ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das durch Interaktion mit Proteinen von Mikrotubuli deren Aufbau und Stabilität beeinflusst. Durch alternatives Spleißen können sechs Isoformen gebildet werden, die sich in der Anzahl an Tandem Repeats, welche für die Mikrotubuli-Bindung verantwortlich sind, unterscheiden. Eine Hyperphosphorylierung von Tau führt einerseits zum Verlust der Mikrotubuli-Bindung und andererseits durch Aggregation des hyperphosphorylierten Tau mit sich selbst zur Entstehung der helikalen Tau-Filamente (Querfurth & LaFerla, 2010; Spillantini & Goedert, 2013).



Der neurodegenerative Prozess durch die Bildung von extrazellulären A β -Plaques und intrazellulären Neurofibrillen aus p-Tau beginnt zunächst lokal und breitet sich dann über den Kortex bis in sensorische und motorische Hirnregionen aus. Dabei liefern Lokalisation und Dichte der Neurofibrillen eine Möglichkeit zur Einteilung der Erkrankung in Stadien, den so genannten Braak Stadien I-VI (Abb. 1) (Braak & Braak, 1991).

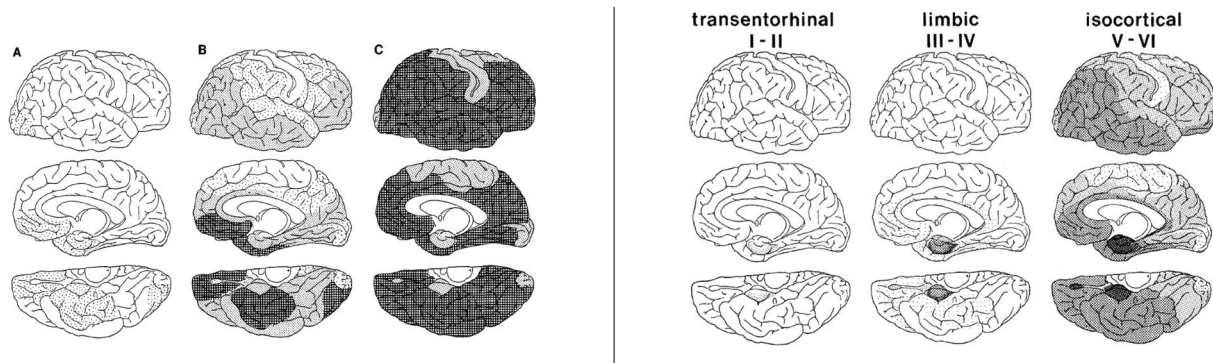


Abb. 1: Graphische Darstellung der Ausbreitung von Amyloid-Plaques (A-C links) und neurofibrillären Tau-Tangles (I-VI rechts) mit Fortschreiten der Erkrankung nach Braak & Braak 1991 (Braak & Braak, 1991)

Bis heute ist eine gesicherte Diagnose nur durch einen für diese charakteristische neuropathologische Veränderung positiven, histopathologischen Befund in Form einer Hirnbiopsie zu gewährleisten und kann daher ausschließlich post-mortem erfolgen. Die klinische Diagnose Morbus Alzheimer kann zu Lebzeiten folglich nur durch systematischen Ausschluss anderer Demenzen gestellt werden. Die Exklusivdiagnose orientiert sich dabei an den Leitlinien der ICD-10-GM („International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems“, German Modification, 10th edition, siehe Box 2), der DSM-IV („Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders“, 4th edition) und den sogenannten NINCDS-ADRDA-Kriterien, einem Diagnose-Konzept des „National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke“ in Kooperation mit der „Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association“ (G. McKhann et al., 1984; G. M. McKhann et al., 2011).

Box 2: Definition Alzheimer-Krankheit nach ICD-10-GM Klassifizierung inklusive Schlüsselnummer der Subkategorien (Version 2015)

F00.* Demenz bei Alzheimer-Krankheit (G30.-+)

Die Alzheimer-Krankheit ist eine primär degenerative zerebrale Krankheit mit unbekannter Ätiologie und charakteristischen neuropathologischen und neurochemischen Merkmalen. Sie beginnt meist schleichend und entwickelt sich langsam aber stetig über einen Zeitraum von mehreren Jahren.

F00.0* Demenz bei Alzheimer-Krankheit, mit frühem Beginn (Typ 2) (G30.0+)

Demenz bei Alzheimer-Krankheit mit Beginn vor dem 65. Lebensjahr. Der Verlauf weist eine vergleichsweise rasche Verschlechterung auf, es bestehen deutliche und vielfältige Störungen der höheren kortikalen Funktionen.

Alzheimer-Krankheit, Typ 2

Präsenile Demenz vom Alzheimer-Typ

Primär degenerative Demenz vom Alzheimer-Typ, präseniler Beginn

F00.1* Demenz bei Alzheimer-Krankheit, mit spätem Beginn (Typ 1) (G30.1+)

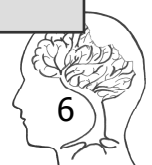
Demenz bei Alzheimer-Krankheit mit Beginn ab dem 65. Lebensjahr, meist in den späten 70er Jahren oder danach, mit langsamer Progredienz und mit Gedächtnisstörungen als Hauptmerkmal.

Alzheimer-Krankheit, Typ 1

Primär degenerative Demenz vom Alzheimer-Typ, seniler Beginn

Senile Demenz vom Alzheimer-Typ (SDAT)

Quelle 6: Text übernommen von www.icd-code.de



Hierbei liefern Eigen- und Fremdanamnese zu Krankheitsbeginn, Symptomatik und Begleitsymptomen sowie eine Familienanamnese zur Klärung etwaiger erblicher Ursachen einen ersten Anhaltspunkt. Neuropsychologische Tests zeigen eventuelle kognitive Defizite in verschiedenen Bereichen auf. Funktionelle und strukturelle Bildgebung geben in Kombination mit verschiedenen Blutanalysen (z.B. VitaminB12, THS) und entsprechender Liquor-Diagnostik (z.B. A β 42, Tau und p-Tau) weitere Informationen für die Diagnosestellung. Eine frühe Diagnose der progredienten Erkrankung innerhalb des „diagnostischen Fensters“ ist wichtig, um das für die Behandlung vorhandene „therapeutische Fenster“ maximal ausschöpfen zu können (Abb. 2).

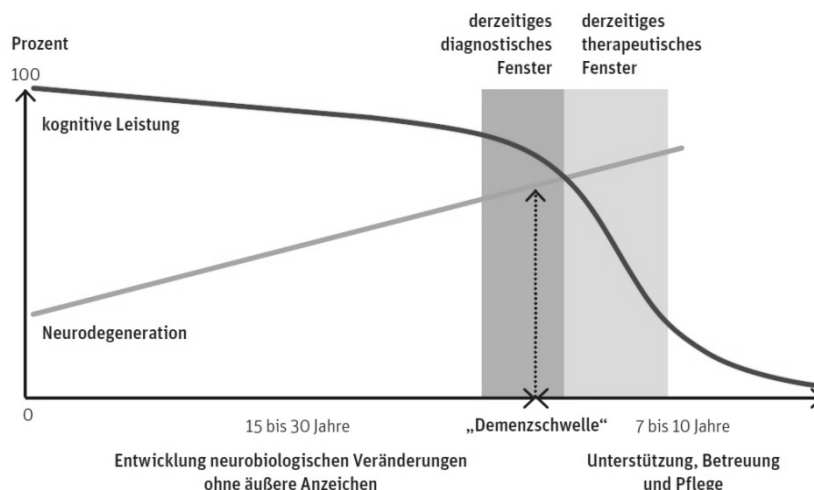


Abb. 2: Schematischer Verlauf von Neurodegeneration und kognitiver Leistung bei dementiellen Erkrankungen

Der eigentliche Erkrankungsbeginn liegt bereits viele Jahre zurück bis durch den Abfall kognitiver Leistungen schließlich erste Symptome hervorgerufen werden, welche eine Diagnose ermöglichen. Die medikamentöse Therapie zur Verzögerung der progredienten Erkrankung ist nur innerhalb eines relativ beschränkten Zeitraums, dem therapeutischen Fenster, wirksam. Die durchschnittliche Erkrankungsdauer nach der Diagnosestellung beträgt etwa 7-10 Jahre.

Quelle 7: Grafik entnommen aus „Demenz-Report Wie sich die Regionen in Deutschland, Österreich und der Schweiz auf die Alterung der Gesellschaft vorbereiten können“; Sabine Sütterlin, Iris Hoßmann, Reiner Klingholz; Berlin-Institut für Bevölkerung und Entwicklung; Erste Auflage, Februar 2011

Die durchschnittliche Erkrankungsdauer dieser irreversiblen Demenzform ist stark abhängig vom Erkrankungsalter und liegt durchschnittlich bei etwa 7-10 Jahren.

1.2.3. Therapiemöglichkeiten bei Morbus Alzheimer

Derzeit sind zur Behandlung von AD fünf Antidementiva zugelassen, die eine Abmilderung der kognitiven Defizite und eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufs ermöglichen. Die Ursachen der Erkrankung aber nicht bekämpfen und daher keine Heilungschancen bieten. Alle fünf antidementiva basieren darauf, durch Beeinflussung der Signalübertragung an Synapsen beeinträchtigte Neurotransmissionssysteme wiederherzustellen. Donepezil, Galantamin, Rivastigmin und Tacrin gehören zur Gruppe der Acetylcholinesterase-Inhibitoren und sollen den Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin im synaptischen Spalt von Nervenzellen blockieren. Tacrin wird jedoch aufgrund der starken toxischen Wirkung auf die Leber nicht mehr eingesetzt. Memantin - ein Glutamatrezeptorantagonist - verhindert hingegen die Übertragung des Neurotransmitters Glutamat durch Blockade der NMDA-Rezeptoren (Lancôt, Rajaram, & Herrmann, 2009). Acetylcholinesterase-Inhibitoren werden bei leichten bis mittelschweren, der NMDA-Antagonist bei



mittelschweren bis schweren Demenzen vom Alzheimer-Typ eingesetzt. Nicht alle Betroffenen sprechen auch auf diese Medikamente an. Erfahrungsgemäß ist die Wirksamkeit der Antidementiva nicht nur auf wenige Patienten sondern auch zeitlich begrenzt und mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden. Zusätzliche mit der Erkrankung selbst oder auch mit deren Behandlung einhergehende Begleiterkrankungen wie Depressionen, Schlafstörungen u.ä. werden entsprechend medikamentös therapiert. Zur Aufrechterhaltung der kognitiven Fähigkeiten, Sprach- und Bewegungsstörungen werden zusätzlich physio-, ergotherapeutische und logopädische Therapieansätze angewandt (Kurz, 2013).

Neben den oben genannten Behandlungen, haben eine Vielzahl an Entwicklungsprogrammen versucht, Kernpathologien der Alzheimer Erkrankung (z.B. Inhibierung von Tau-phosphorylierenden Kinasen, beta und gamma Sekretase) zu modulieren, aber aufgrund von Nebenwirkungen oder Unwirksamkeit oft nicht die Zulassungsphase erreicht. Vielversprechende Ergebnisse zeigen Immuntherapien (z.B. Solanezumab, Aducanumab) erzielt, die insbesondere die Entstehung von Amyloid-Plaques verhindern oder die Clearance von A β 42 verbessern sollen. Eine entsprechende Übersicht ist unter www.alzforum.org/therapeutics/ zusammengestellt.

1.2.4. Genetik

Die von Katzmann vorgeschlagene Einteilung dieser primären Demenz in Abhängigkeit vom Erkrankungsbeginn ist durch die Unterscheidung in einen präsenilen und einen senilen Subtyp bis heute erhalten geblieben.

Nur etwa 1-2 % aller Erkrankten leiden an einer präsenilen Demenz vom Alzheimer-Typ, bei welcher entsprechende Symptome bereits vor dem 65. Lebensjahr auftreten und die aufgrund des frühen Erkrankungsbeginns häufig auch als „early-onset Alzheimer-Disease“ (*kurz*: EOAD) bezeichnet wird (Poirier et al., 2014). Erfahrungsgemäß sind etwa 30-50 % aller präsenilen Demenzen vom Alzheimer-Typ auf eine von mehr als 230 verschiedenen pathogenen Mutationen in drei Genen - APP (Amyloid-Precursor-Protein), PSEN1 (Presenilin 1) oder PSEN2 (Presenilin 2) – zurückzuführen, die in der Regel Auswirkungen auf die Prozessierung von APP selbst haben oder die die A β -Clearance im Gehirn beeinflussen.²

Die meisten dieser Missense-Mutationen (Insertion, Deletion oder Duplikation) sind autosomal-dominant vererbbar und weisen eine Penetranz von mehr als 85 % auf (Reitz & Mayeux, 2014). Daher sind diese genetischen Veränderungen vielfach innerhalb einer Familie bei mehreren Mitgliedern und in mehr als zwei Generationen nachweisbar (engl.: early-onset familial, *kurz*: EO-FAD), können aber sehr selten auch ohne familiären Hintergrund auftreten (Zou, Liu, Che, & Huang, 2014).

Der mit 98-99 % am häufigsten vorkommende Subtyp tritt typischerweise erst nach dem 65. Lebensjahr auf und wird daher auch als senile Demenz vom Alzheimerstyp bezeichnet (engl.: late-onset Alzheimer's Disease; *kurz*: LOAD) (Mayeux & Stern, 2012; Poirier et al., 2014; Reitz & Mayeux, 2014). Für LOAD konnten bislang keine einem Mendelschen Erbgang folgenden Mutationen beschrieben werden.

² Siehe auch: www.molgen.vib-ua.be/ADMutations(Cruts, Theuns, & Van Broeckhoven, 2012) und www.alzforum.org/mutations



Der bekannteste und gleichzeitig stärkste genetische Risikofaktor ist der Genotyp des ApolipoproteinE (*kurz: APOE*, Chromosom 19). Dieses Lipoprotein ist für den Transport von Lipiden insbesondere von Cholesterin aus dem Blut beteiligt und spielt auch beim Auf- und Abbau von Abeta im Gehirn eine wesentliche Rolle (Kanekiyo, Xu, & Bu, 2014; Tanzi, 2012). Innerhalb des humanen *APOE* Locus auf Chromosom 19 sind zwei Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl.: **Single Nucleotide Polymorphism**, *kurz: SNP*) bekannt, die zu drei relativ weit verbreiteten Allelvarianten führen (Poirier et al., 2014). Die apoE-ε3 Allelvariante ist mit 78% die am häufigsten vorkommende und scheint keinen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko auszuüben. Im Gegensatz hierzu wird der selten vorkommenden apoE-ε2 Allelvariante (8%) ein eher protektiver Effekt zugeschrieben. Das mit 15% am zweithäufigsten (15%) vorkommende apoE-ε4 Allel ist gleichzeitig auch ein Risikoallel, da dessen Träger in 40% aller Fälle auch Alzheimer Patienten sind (Corder et al., 1994; Kanekiyo et al., 2014; Poirier et al., 2014).

Dabei sinkt mit der Anzahl an apoE-ε4 Allelen, also in Abhängigkeit von der Dosis (ca. 5 Jahre pro ε4-Allel), zum einen das Erkrankungsalter - v.a. bei *APP* und *PSEN2* Mutationsträgern - und zum anderen steigt die Wahrscheinlichkeit an Alzheimer zu erkranken um das 3-15 fache.

Zusätzliche genetische Risikofaktoren konnten zuletzt in mehreren großen, genomweiten Assoziationsstudien (*kurz: GWAS*) und Meta-Analysen identifiziert werden. Mehr als 20 genetische Loci konnten signifikant mit der Erkrankung assoziiert werden (z.B. *ABCA7*, *BIN1*, *CLU*, *CR1*, *PICALM*, *EPHA1*, *SORL1*; siehe auch [AlzGene](#)) (Harold et al., 2009; Hollingworth et al., 2011; Lambert et al., 2013; Naj et al., 2011).

Wie und ob diese Gen-Produkte an Alzheimer assoziierten Stoffwechselwegen wie beispielsweise Abeta-Ablagerung und Aggregation, Entzündungsprozesse und fehlerhafter synaptischer Signaltransduktion beteiligt sind muss allerdings noch aufgeklärt werden. Zunehmend untersucht man auch in Familien neu auftretende, sehr seltene Genvarianten so genannte „rare variants“, die mit einer Allelfrequenz von weniger als 1% in der Bevölkerung auftreten, wie beispielsweise in dem Gen *TREM2* (Lord, Lu, & Cruchaga, 2014).

Aus Studien mit Zwillingen weiß man, dass EOAD und LOAD zu etwa 80 % auf Vererbung basieren (Zou et al., 2014). Dies ist zusammen mit den derzeit bekannten Risikofaktoren und -loci, sowie Umwelteinflüsse und Lebensstil (z.B. Diabetes mellitus, erhöhte Cholesterinwerte, Schädel-Hirn-Traumata, geistige und körperliche Fitness) (Jiang, Yu, Tian, & Tan, 2013; Reitz & Mayeux, 2014) nicht ausreichend um alle Alzheimer-Fälle erklären. Es müssen also weitere nicht auf der DNA-Sequenz basierende Veränderungen an der Pathogenese dieser multifaktoriellen Erkrankung beteiligt sein.

Damit rücken insbesondere epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung/Hydroxymethylierung, Histonmodifikationen und kleine nicht-kodierende Ribonukleinsäuren in den Fokus der Alzheimer Forschung.

1.2.5. Epigenetik

Epigenetik ist ein 1942 von Conrad Hal Waddington (*1905, †1975) geprägter Begriff, der sich im Gegensatz zur klassischen Genetik mit neben oder über der DNA-Sequenz abspielenden Prozessen wie der Regulation der Genexpression befasst. Die Aktivität eines Gens kann durch den Verpackungsgrad des Chromatins, den Methylierungsstatus von Cytosinen in CpG-Dinukleotiden der DNA-Sequenz oder auch auf RNA-Ebene gesteuert werden.



1.2.5.1. MicroRNAs

Viele Jahre ging man entsprechend des zentralen Dogmas der Molekularbiologie davon aus, dass RNA nur als ein informatives Intermediat von DNA zu Protein fungiert. Inzwischen weiß man, dass zwar 90% des gesamten humanen Genoms aktiv transkribiert werden, aber nur etwa 1-2 % des Genoms tatsächlich Proteine kodiert. Bei einem Großteil der Transkripte handelt es sich um nicht-translatierte funktionale RNAs. Dazu gehören rRNAs, tRNAs und so genannte non-coding RNAs. Letztere werden in lange nicht-kodierende RNAs (z.B. lincRNAs) und kleine nicht-kodierende RNAs (z.B. miRNAs, siRNAs und snoRNAs) unterteilt. MiRNA kodierende Gene machen etwa 1-2% des Genoms aus und kontrollieren mittels post-transkriptioneller Regulation nahezu 50% aller protein-kodierender Gene (Griffiths-Jones, Grocock, van Dongen, Bateman, & Enright, 2006). (Griffith, Krol, Sana)

MicroRNAs (*kurz*: miRNA oder miR), in den 90er Jahren von Victor Ambros und Kollegen (Ambros) ursprünglich im Fadenwurm *C. elegans* entdeckt, sind inzwischen in Pflanzen, Tieren und Mensch beschrieben. Die Zahl neu identifizierter miRNAs wächst täglich (Griffiths-Jones et al., 2006). Es handelt sich hierbei um etwa 18-25 Nukleotide lange nicht-kodierende RNAs, die zwischen verschiedenen Organismen oft stark konserviert sind. Die meisten miRNA-Gene kommen einzeln in intergenischen Bereichen des Genoms vor, einige verwandte miR-Gene jedoch auch in Clustern (Rodriguez, Griffiths-Jones, Ashurst, & Bradley, 2004). Die im Cluster kodierten miRNAs werden von einem gemeinsamen Promotor reguliert und polycistronisch transkribiert. Es entsteht hierbei ein stammschlaufenartiges Vorläufermolekül mit 200-1000nt Länge, pri-miRNA genannt (Cullen, 2006), welches von Drosha und Pasha zu einem kürzeren Molekül mit 3' Überhang (pre-miRNA) weiterprozessiert wird (Bartel, 2004; Valencia-Sanchez, Liu, Hannon, & Parker, 2006; Yi, Qin, Macara, & Cullen, 2003). Die pre-miRNA wird aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert und dort so von Dicer geschnitten, dass ein doppelsträngiges Molekül (miRNA-miRNA* Duplex) mit zwei 3' Überhängen entsteht (Cullen, 2006).

Der Duplex wird zur Strangselektion in einen Komplex der Argonaut Familie (RISC) inkoooperiert und der Strang mit geringerer Thermostabilität des 5' Endes als funktioneller Strang (reife miRNA) ausgewählt. Der andere Strang wird freigesetzt und durch RNasen abgebaut. Die reife miRNA wird vom RISC-Komplex zur komplementären Sequenz der Ziel-mRNA dirigiert. Die Bindung erfolgt in der Regel im 3' untranslatierten Bereich (3' UTR) der mRNA über die sogenannte „seed-Sequenz“ der reifen miRNA (Majoros & Ohler, 2007). Die Genauigkeit der Bindung entscheidet dann darüber, ob die Ziel-mRNA eine Translationsinhibition (Majoros & Ohler, 2007) erfährt oder degradiert wird. Eine schematische Darstellung der Biogenese von miRNAs ist Abb. 6 zu entnehmen.

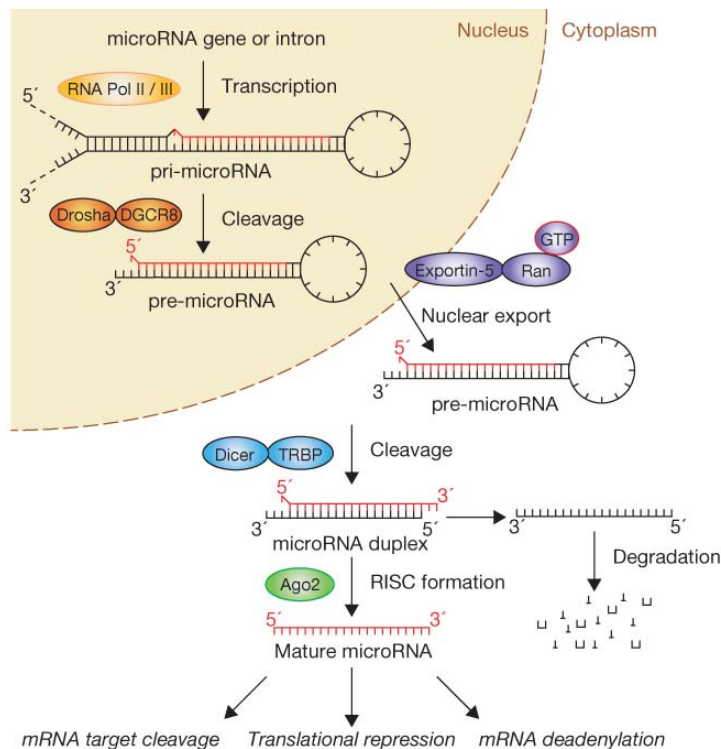


Abb. 6: Biogenese von miRNAs (Winter, Jung, Keller, Gregory, & Diederichs, 2009)

Auf diese Weise sind miRNAs in der Lage eine sehr fein abgestimmte post-transkriptionelle Regulation der Genexpression durchzuführen. Eine miRNA kann hierbei viele verschiedene mRNAs regulieren und eine mRNA kann im Gegenzug von vielen miRNAs reguliert werden. Zudem können miRNAs sowohl konstitutiv als auch erst zu bestimmten Zeitpunkten in bestimmten Geweben exprimiert werden (Lagos-Quintana, Rauhut, Meyer, Borkhardt, & Tuschl, 2003). Die Deregulation einer einzelnen miRNAs kann daher Auswirkungen auf ein breites Spektrum zellulärer Prozesse haben und zur Entwicklung verschiedenster Erkrankungen beitragen.

Inzwischen konnten auch einige miRNAs mit Morbus Alzheimer bzw. krankheitsassoziierten Stoffwechselwegen in Verbindung gebracht werden (Hébert et al., 2008; Kim et al., 2012; Nelson & Wang, 2010; Shaked et al., 2009).

miR-107 und miR-29b binden beispielsweise an BACE, das bei der Prozessierung von APP eine wichtige Rolle spielt (Hebert, Nelson, Wang). miR-132 wurde im Zusammenhang mit dem Spleißen von Exon10 in Tau beschrieben (Smith et al., 2011). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass miR-16 die APP Expression inhibiert (Liu et al., 2012).

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung treten verstärkt dementielle Erkrankungen wie Morbus Alzheimer auf. Die Pathogenese dieser multifaktoriellen Erkrankung beruht auf dem Zusammenspiel natürlicher Alterungsprozesse des Gehirns, Lebensstil, Umwelteinflüsse und genetischer Prädisposition. Die Kenntnisse von zugrunde liegenden Mechanismen der Erkrankung sind von essentieller Bedeutung sowohl für die Entwicklung von neuen Diagnoseverfahren als auch von innovativen therapeutischen Ansätzen. Bereits bekannte Mutationen in Alzheimer relevanten Genen, die an der Entstehung der charakteristischen neuropathologischen Veränderungen beteiligt sind (APP und Preseniline) oder SNPs in so genannten Risikogenen sind nicht ausreichend um die Entstehung der meist sporadisch auftretenden Fälle zu erklären. Daher müssen noch weitere Faktoren an der Entstehung der Erkrankung beteiligt sein. Inzwischen ist bekannt, dass auch epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung/Hydroxymethylierung, Histonmodifikationen und kleine nicht-kodierende Ribonukleinsäuren großen Einfluss auf Alzheimer relevante Prozesse haben. Dabei stellen microRNAs die größte Gruppe der nicht-kodierenden RNAs dar. Sie binden an zu ihnen, ganz oder teilweise komplementäre mRNA-Sequenzen und führen so zu deren Degradation oder Translationsinhibition (Fischer, 2014).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Erstellung eines gemeinsamen genomweiten miRNA und mRNA Expressionsprofils in einer großen Zahl von Alzheimer Patienten und gesunden Kontrollen und die Identifizierung potentieller miRNA Zielgene mit Relevanz zur Alzheimer-Pathogenese. Dazu soll zunächst mittels Mikroarray-Technologie ein genomweites microRNA-Expressionsprofil in kortikalem Gehirngewebe von Alzheimer Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen generiert werden. Da inzwischen einige kleinere Studien zur Expression von microRNAs in Alzheimer beschrieben wurden, sollen die resultierenden Daten mit der Literatur abgeglichen werden. Die auf diese Weise identifizierten genomweit signifikanten miRNAs sollen dann in semiquantitativen real time PCRs (i) technisch validiert, sowie (ii) in einem weiteren kortikalen Gehirngewebe und (iii) in unabhängigen Proben auf Konsistenz überprüft werden. Zusätzlich sollen die Expressionswerte dieser miRNAs mit den Braak Stadien korreliert werden, um eine Regulation über den Krankheitsverlauf zu erfassen. Von Interesse ist auch der zelluläre Ursprung der miRNA-Deregulation. Hierzu werden graue und weiße Substanz voneinander separiert und so die entsprechenden miRNA Expressionslevel in eher Neuronen-reichen und Neuronen-armen Gewebeproben gemessen.

Da die zelluläre Aufgabe der miRNAs in der Regulation von mRNAs besteht, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit außerdem ein genomweites mRNA-Expressionsprofil in den gleichen Gewebeproben erstellt werden, um anschließend die genomweit signifikanten Daten beider Expressionsprofile miteinander zu korrelieren. Die so identifizierten potentiellen miRNA-Zielgene sollen mit bereits validierten bzw. vorhergesagten Zielgenen der Literatur abgeglichen und auf entsprechende microRNA Bindestellen im 3'UTR Bereich untersucht werden.

Zur Planung weiterführender Experimente sollen die Expressionslevel der zuvor identifizierten genomweit signifikanten miRNAs in einem triple-transgenen Alzheimermausmodell analysiert werden. Zusätzlich sollen in einer humanen Zell-Linie die betreffenden miRNAs durch Transfektion mit entsprechenden Plasmiden hoch bzw. herunterreguliert werden. Die Gesamtheit aller in der vorliegenden Studie durchzuführenden Experimente und Analysen sind in nachfolgender Abbildung (Abb. 7) übersichtlich zusammengefasst.



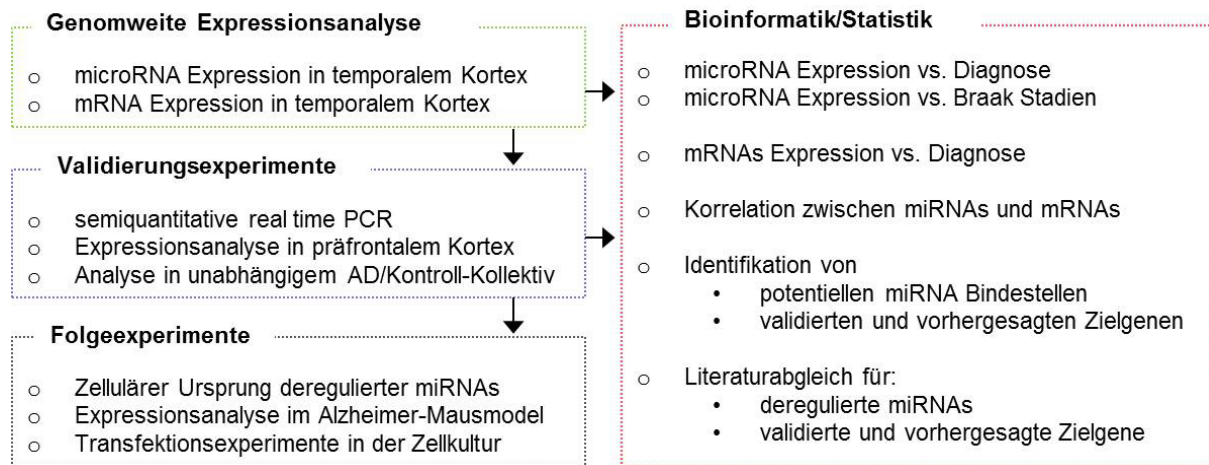


Abb. 7: Übersicht der Experimente und Analysen der vorliegenden Arbeit

2. MATERIALIEN

2.1. Chemikalien von A bis Z

Chemikalie	Bezugsquelle (Firma, Ort, Land)
A Agarose (LE)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz (Ph. Eur.) Pharmagrade	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
B Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
C Rotipuran® Trichlormethan/Chloroform (p.a.)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
D doppelt deionisiertes Wasser (ddH ₂ O, aqua bidest)	Hauseigene Millipore-Anlage
Dulbecco's modified Eagle's Medium - high glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
E Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol p.a.	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol vergällt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
F Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
G GelRed™	Biotium, Hayward, CA, USA
H Ham's F12	PAA, Pasching, Österreich
I Isopropanol p.a.	Fisher Scientific, USA
Isopropanol vergällt	Fisher Scientific, USA
L LB-Agar	Sigma, Deisenheim, Deutschland
LB-Broth (Lennox)	Sigma, Deisenheim, Deutschland
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
N Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nuclease free water	Lonza, USA
O OptiMEM I	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
P Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Steriles Dulbeccos Saline phosphate buffer PBS (Zellkultur)	Sigma, Deisenheim, Deutschland
ProLong Gold Antifade reagent with DAPI	LifeTech, USA
Q QIAzol Lysis Reagent	Qiagen, Maryland, USA
R Recovery cell culture freezing Medium	Gibco, USA
RNAlater RNA Stabilization Reagent	Qiagen, Maryland, USA
RNaseZap	Ambion, USA
S (D+) Saccharose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
T Rotiphorese 10xTBE	Roth, Karlsruhe, Deutschland
10xTE Puffer	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
0.05% Trypsin/EDTA (1x)	Gibco, USA
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
X Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2.2. Geräte

	Gerät	Hersteller
Brutschrank	Galaxy 170S	Eppendorf (New Brunswick), Hamburg, Deutschland
Elektrophoresekammern	Sub-Cell® GT	Bio-Rad Lab. GmbH, München, Deutschland
	Sub-Cell® 192	Bio-Rad Lab. GmbH, München, Deutschland
	Mini Sub-Cell®GT	Bio-Rad Lab. GmbH, München, Deutschland
Homogenisieren	Precellys24	Peqlab (Bertin Technologies), Erlangen, Deutschland
Illumina Plattform inkl. Zubehör	Hybridization Oven	Illumina, Eindhoven, Niederlande
	HiScan	Illumina, Eindhoven, Niederlande
	Te-Flow	Illumina Inc (Tecan), Eindhoven, Niederlande
	Hybex Microsample Incubator	Illumina Inc (SciGene), Eindhoven, Niederlande
	HighSpeed microplate shaker	Illumina Inc, Eindhoven, Niederlande
	ALPS™ 25 Manual Heat Sealer	Illumina Inc (Thermo Scientific), Eindhoven, Niederlande
Magnetrührer	MSH basic	Yellow line, München, Deutschland
Mikroskope	Leica DM5000B Fluoreszenzmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
	Microscope IT 300	VWR, Leuven, Belgien
Mikrowelle	Microwave 800	Severin, Sundern, Deutschland
Pipetten	Pipetten / Multipetten / Transferpetten	Brand, Wertheim, Deutschland
pH-Meter	pH-Meter Lab Phenomenal P100L	VWR, Darmstadt, Deutschland
Photometer	NanoQuant Infinite M200	Tecan, Männedorf, Schweiz
Quality/Quantity	Bioanalyzer 2100	Agilent, Santa Clara/CA, USA
Real time PCR-Cycler	StepOne Plus	Applied Biosystems, Foster City/CA, USA
	7500 Fast	
Reinstwassersystem	Milli-Q Advantage	Millipore Corporation, Billerica/MA, USA
	Milli-Q Q-Pod®	Millipore Corporation, Billerica/MA, USA
Schüttler	Roto-Shake Genie	Scientific Industries, NY, USA
	Thermomixer Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Spannungsgeräte	PowerPac™HV	Bio-Rad Lab. GmbH, München, Deutschland
	PowerPac™ Basic	Bio-Rad Lab. GmbH, München, Deutschland
Spotter	MassARRAY™ Nanodispenser R	Sequenom™(RoboDesign), San Diego/CA, USA
	MassARRAY™ Nanodispenser RS1000	Sequenom™, San Diego/CA, USA
Sterilbank	HeraSafe HS12 Heraeus	Kendro Laboratory, Hanau, Deutschland
Thermocycler	GeneAmp® PCR System 9700 (96-well)	Applied Biosystems, San Diego/CA, USA
UV-Transilluminator	Transilluminator BioView UV light	Biostep®, Billerica/MA, USA
Vortexer	Vortex-Genie2	Scientific Industries, NY, USA
	UNIMAG ZX3	UniEquip, Planegg, Deutschland
Waage	Adventurer™	OHAUS, NJ, USA
Wasserbad	Thermolab®	GFL, Burgwedel, Deutschland
	Inkubations-/Inaktivierungswasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.3. Verbrauchsmaterial und Zubehör

Anwendung	Bezeichnung	Herstellerangaben
Homogenisation	Chirurgische Einmalskalpelle	BRAUN
	Kanülen 100 Sterican Durchmesser 0,60 x 25 mm/23G x 1''	BRAUN
	Kanülen 100 Sterican Durchmesser 0,90 x 70mm/20G x 2 3/4 ''	BRAUN
	Spritzen 1ml Insulin 40 I.U.	BD Plastikpak
	Mikropistillen	Eppendorf, Hamburg Deutschland
	Precellys Keramik-Kit 1,4 mm 2 ml Reagiergefäße	peqlab, Erlangen, Deutschland
Plastikware	Röhre (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	96 well Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	1,5 ml und 2ml Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	1,5 ml Biosphere Safe Seal Reagiergefäße	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	0,2 ml 8er-Stripes und 8er-Caps	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	MicroAmp optical reaction plates 96-well with Barcode	Applied Biosystems
Folien	Folie für 96-well Platten (PCR und Real Time PCR)	ThermoScientific oder Axon
Pipettenspitzen	Glas-Pasteurpipetten (150 mm, 250 mm)	VWR international, Belgien
	Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	One Touch Tips	Sorenson, Bio Science, Utah, USA
	Filterspitzen	Greiner Bio-one oder Sarstedt
Zellkultur	Cryo Freezing Container (Mr.Frosty)	Nalgene
	Deckgläser, rund, 13mm	PrimeGlass, Forstinning, Deutschland
	Objektträger 76x26mm	Carl Roth, Karlsruhe Deutschland
	Cellstar® Zellkultur-Flaschen (50 ml, 250 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
	Cellstar® Zellkultur-Platten (6-, 24-, 96-Loch)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
	Cellstar® Zellkultur-Schalen (100 x 20 mm)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
	Cryo-Röhrchen (2ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
	Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland

2.4. Internet Tools, Software und PC-Programme

Internet Tools	
miRWalk	http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/
RNAhybrid	https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid
UCSC	https://genome.ucsc.edu/
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Software	
Rgui	https://www.r-project.org/
BeadStudio Illumina	Illumina Software zur Mikroarray Auswertung
Software SDS v1.3.1	Software Real Time Cyclers 7500 Fast
Software v2.2.2	Software Real Time Cyclers StepOne Plus
i-control TM Software	Software NanoQuant Infinite M200
Bioanalyzer 2100 expert	Software Bioanalyzer



PC-Programme

Gimp	Bildbearbeitung
Mendeley	Literaturverwaltung
powerpoint	Diagrammerstellung
Excel	Tabellenkalkulation
Word	Textverarbeitung
PDF24 Creator	Erstellung von PDF Dateien

2.5. Größenstandards in der Gelelektrophorese

Zur Ermittlung der Fragmentgrößen bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von Nukleinsäuren und PCR-Produkten wurde der GeneRuler Ladder Mix oder der pUC19DNA/MspI (HpaII) Marker der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) genutzt. Die Fragmentgrößen beider Größenstandards sind in Abb. 8 dargestellt.

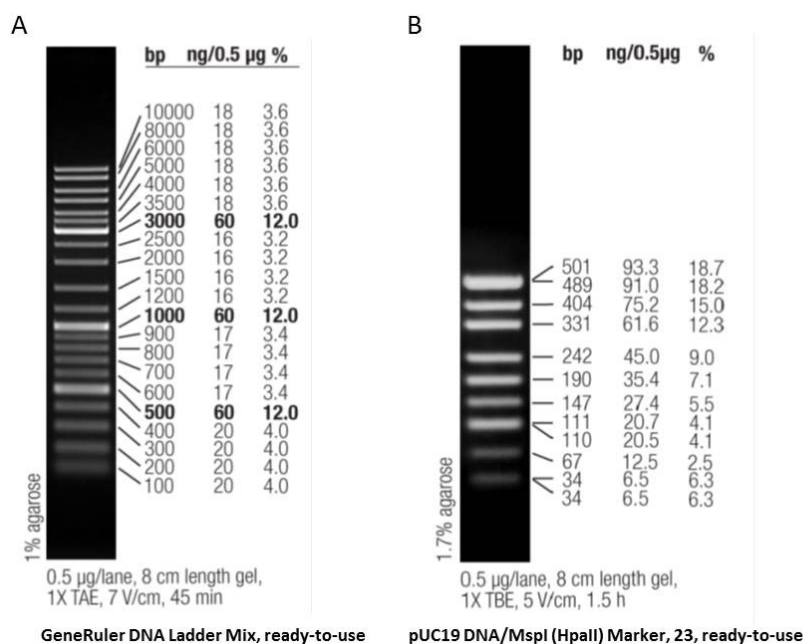


Abb. 8: Bei Gelelektrophoresen verwendete Größenstandards der Firma Fermentas
(A) Gene Ruler Ladder Mix und (B) pUC19 DNA/MspI (HpaII)

2.6. Reaktionskits**2.6.1. Reaktionskits zur RNA- und Plasmid-Extraktion:**

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen	Maryland, USA
miRNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland
RNase-free DNase Set	Qiagen	Hilden, Deutschland
Plasmid Midi Kit	Qiagen	Hilden, Deutschland

2.6.2. Reaktionskit zur Bestimmung des RIN-Wertes im Bioanalyzer (Agilent):

RNA 6000 Nano Kit	Agilent	Waldbronn, Deutschland
-------------------	---------	------------------------

2.6.3. Mikroarrays und zugehörige Reaktionskits:

Geniom Biochips miRNA human miRBase 16 plus	febit biomed GmbH	Heidelberg, Deutschland
Sentrix Bead Array HT12v4	Illumina	
Illumina whole genome amplification Kit (AMIL 1791)	Ambion	

2.6.4. Reaktionskits zur Reverse Transkription und semiquantitativen real time PCR:

microRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	Foster City, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	Foster City, USA
TaqMan Universal PCR Mastermix, No Amp Erase UNG	Applied Biosystems	Foster City, USA
TaqMan Gene Expression Mastermix	Applied Biosystems	Foster City, USA

2.7. Oligonukleotide für die reverse Transkription und semiquantitative real time PCR

verwendete TaqMan RT-Primer:

Assay Name	Spezies	Fluoreszenz	Assay ID
hsa-miR-132-3p	hsa + mmu	FAM	RT457
hsa-miR-212-3p	hsa	FAM	RT000515
mmu-miR-212	mmu	FAM	RT002551
U6snRNA	mmu	FAM	RT001973
RNU48	hsa	FAM	RT1006

verwendete TaqMan miRNA Assays:

Assay Name	Spezies	Fluoreszenz	Assay ID
hsa-miR-132-3p	hsa; mmu	FAM	TM000457
hsa-miR-212-3p	hsa	FAM	TM0515
mmu-miR-212	mmu	FAM	TM002551
U6snRNA	mmu	FAM	TM1973
RNU48	hsa	FAM	TM001006

verwendete TaqMan Assays:

Assay Name	Spezies	Fluoreszenz	Assay ID
APP	hsa	FAM	Hs00169098_m1
MAPT	hsa	FAM	Hs00213491_m1
GAPDH	mmu	FAM	Mm99999915_g1
18S	hsa	VIC pl	Hs99999901_s1

Die nachfolgenden Oligonukleotide zur Genotypisierung der 3xTg Mäuse wurden nach den Vorgaben des Jackson Laboratory bei der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) bestellt:

Oligo_ID	Sequenz 5'-3'	ID_JAX
For_PSEN1:	AGGCAGGAAGATCACGTGTTCAAGTAC	IMR1586
Rev_PSEN1:	CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC	IMR1587

2.8. Enzyme und Antibiotika

(a) Polymerase für die PCR:

HotStar Taq Qiagen, Hilden, Deutschland

(b) Restriktionsenzym und zugehöriger Puffer:

BstII (10⁴U/ml) New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
 10xNEB Buffer3 New England Biolabs, Ipswich, MA, USA



- (c) Antibiotika:
 Ampicillin Na-Salz AppliChem, Darmstadt, Deutschland
 Puromycin (10mg/ml) Invitrogen / Gibco
- (d) Sonstige Enzyme:
 ProteinaseK Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.9. Lösungen und Puffer

2.9.1. 6xLadepuffer (eigene Herstellung) für die Gelelektrophorese:

Substanz	Prozentualer Anteil	Mengen in g für 50 ml
Saccharose	40%	20 g
Bromphenolblau	0,05 %	0,025 g
Xylencyanol	0,05 %	0,025 g
ddH ₂ O		ad 50 ml

2.9.2. GelRed™ Ladepuffer Mix und GelRed™ Bad

Die Ursprungslösung (10.000x) wird zunächst im Verhältnis 1:100 in ddH₂O verdünnt und anschließend im Verhältnis 1:4 mit 6x Ladepuffer gemischt. Die Zugabe dieser interkalierenden Substanz zur Detektion von Nukleinsäuren im Agarosegel ist nicht zur Bestimmung der exakten Fragmentgröße geeignet, da es die Laufeigenschaften einzelner Fragmente unterschiedlich stark beeinflussen kann. Eine Alternative zur direkten Zugabe zur Probe (pre-stain) bietet die Inkubation des Agarosegels in einem GelRed™ Bad (post-stain). Das Färbebad wird analog der Angaben des Herstellers angesetzt und mehrfach wiederverwendet.

2.9.3. 2xLysepuffer zur Extraktion von gDNA aus Mausschwanzbiopsien:

Substanz	Konzentration	Menge in ml	Endkonzentration in 30ml
Tris/HCl (pH 8,5)	1 M	6 ml	200 mM
EDTA (pH 8)	0,5 M	0,6 ml	10 mM
SDS	20%	0,6 ml	0,4 %
NaCl	1 M	12 ml	400 mM
ddH ₂ O		10,8 ml	

2.9.4. Herstellung des Nukleotidmixes (25mM each) für PCR-Reaktionen (Solis BioDyne, Tartu, Estland):

Substanz	Menge in µl
dATP	25 µl
dCTP	25 µl
dTTP	25 µl
dGTP	25 µl
ddH ₂ O	900 µl



2.9.5. Agar und Lösungen für die Transformation:

(a) LB-Medium:

LB-Broth*	10 g
ddH ₂ O	0,5 l
pH 7,5 eingestellt mit 1M NaOH	

(* nach Lennon, enthält: 10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl)

(b) LB-Agar:

LB-Agar*	17,5 g
ddH ₂ O	0,5 l

(* enthält: 15g/l Agar, 10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl)

Sowohl LB-Medium als auch LB-Agar werden nach dem Lösen autoklaviert.

(c) Ampicillin-Lösung:

Ampicillin-Natriumsalz (Ph. Eur.) reinst, Pharmaqualität	100mg
RNase-DNase freies H ₂ O	ad 1 ml

Zur Herstellung von LB-Amp-Agar Platten werden 500ml autoklavierter LB-Agar mit 500µl Ampicillin (Endkonzentration: 100µg/ml) versetzt. Die Platten werden kopfüber bei 4°C gelagert.

2.10. Humane Gehirngewebe

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Gehirngewebe wurden von der Gehirngewebesbank München (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung München (ZNP); koordiniert die Europäische Hirngewebesbank (BNE) und Brain-Net Deutschland; http://www.neuropathologie.med.uni-muenchen.de/neurobiobank_muenchen/index.html) und der niederländischen Hirngewebesbank (Niederländisches Institut für Neurowissenschaften, Amsterdam; <https://www.brainbank.nl/>) als post-mortem frisch, eingefrorenes Gewebe bezogen. Zu allen Proben lag eine schriftliche Einwilligung der Gewebespende zur Gehirnautopsie und zur Verwendung des Gewebes sowie der zugehörigen klinischen Daten zu Forschungszwecken vor. Die klinische Diagnose „Morbus Alzheimer“ (AD) erfolgte gemäß NINCDS-ADRDA Kriterien (G. McKhann et al., 1984; G. M. McKhann et al., 2011). Für das initiale microRNA Screening wurden 64 temporale Kortexe der Münchner Hirngewebesbank herangezogen, im Folgenden als MUC Kohorte bezeichnet. Zur Validierung der Ergebnisse wurden temporale (TC) und präfrontale Kortexe (PFC) von acht AD-Kontroll-Paaren (AD/CTRL) des gleichen Kollektivs (MUC Validierungsset) und präfrontalen Kortexen eines unabhängigen Kollektivs aus 225 AD und 87 kognitiv gesunden Kontrollen der niederländischen Hirngewebesbank (NBB Validierungsset) mittels semiquantitativer real time PCR analysiert.



Des Weiteren wurden aus dem NBB Validierungsset acht präfrontale Kortizes weiblicher Spender ähnlichen Alters ausgewählt und das Gewebe in weiße und graue Substanz separiert (NBB graue/weiße Substanz). In nachfolgenden Tabellen (Tab. 1 und

Tab. 2) sind Informationen zu den aufgeführten Kohorten bzw. den einzelnen temporalen bzw. präfrontalen Kortizes übersichtlich zusammengefasst.

Tab. 1: epidemiologische Daten zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben

Allgemeine Informationen zu den in der vorliegenden Arbeit analysierten humanen post-mortem Gehirngewebeproben (MUC = Münchner Hirngewebsbank, NBB = niederländische Hirngewebsbank, AD = Alzheimer, CTRL = Kontrolle, sqPCR = semiquantitative real time PCR)

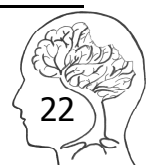
Kohorte	Proben	N =	Alter (MW \pm SD) [Jahre]	post-mortem Zeit (MW \pm SD) [Std]	Braak Stadium (MW \pm SD)	APOE ϵ 4 Träger [%]	Gewebe	Experiment
MUC Kohorte	AD	39	80,4 \pm 8,2	30,2 \pm 16,6	5 \pm 1	64,1	Temporalere Kortex	genomweites miRNA (febit MPEA microarray h_v16plus, mirBase16)
	männlich	15	78,9 \pm 7,4	33,9 \pm 17,9	5 \pm 1	66,7		
	weiblich	24	81,3 \pm 8,7	26,2 \pm 14,7	5 \pm 0	60,0		und
	CTRL	25	65,3 \pm 16,9	23,4 \pm 10,4	1 \pm 1	16,0		genomweites mRNA
	männlich	15	59,4 \pm 16,7	24,9 \pm 10,9	2 \pm 1	10,0		Expressionsprofil (Illumina Sentrix bead arrays HT12v4, RefSeq38)
	weiblich	10	74,2 \pm 13,3	22,5 \pm 10,5	1 \pm 1	20,0		
MUC Validierungsset	AD	8	78,0 \pm 8,3	30,4 \pm 15,5	6 \pm 0	37,5	Temporalere Kortex und präfrontaler Kortex	sqPCR für miR-132 und miR-212 mittels TaqMan Assays
	männlich	3	74,3 \pm 12,5	38,00 \pm 17	6 \pm 1	33,3		
	weiblich	5	80,2 \pm 5,2	27,40 \pm 15,7	6 \pm 0	40,0		
	CTRL	8	78,4 \pm 8,1	30,4 \pm 12,4	2 \pm 1	12,5		
	männlich	3	75,0 \pm 12,0	31,0 \pm 15,4	2 \pm 1	33,3		
	weiblich	5	80,4 \pm 5,3	30,0 \pm 12,1	3 \pm 1	0		
NBB Validierungsset	AD	225	79,4 \pm 11,0	5,3 \pm 1,4	5 \pm 1	66,2	Präfrontaler Kortex	sqPCR für miR-132 und miR-212 mittels TaqMan Assays
	männlich	67	74,4 \pm 10,8	5,2 \pm 1,3	5 \pm 1	70,2		
	weiblich	158	81,5 \pm 10,5	5,3 \pm 1,5	5 \pm 1	64,6		
	CTRL	87	81,8 \pm 9,2	6,7 \pm 2,0	2 \pm 1	24,1		
	männlich	37	82,1 \pm 7,4	7,2 \pm 2,2	2 \pm 1	21,6		
	weiblich	50	81,7 \pm 10,4	6,3 \pm 1,8	2 \pm 1	26,0		
NBB graue/weiße Substanz	AD	8	84,8 \pm 8,4	5,4 \pm 1,6	5 \pm 1	0	Präfrontaler Kortex	sqPCR für miR-132 und miR-212 mittels TaqMan Assays
	männlich	-	-	-	-	-		
	weiblich	8	84,8 \pm 8,4	5,4 \pm 1,6	5 \pm 1	0		
	CTRL	8	85,1 \pm 6,1	6,4 \pm 0,7	1 \pm 0	0		



männlich	-	-	-	-	-
weiblich	8	85,1 ± 6,1	6,4 ± 0,7	1 ± 0	0

Tab. 2: Detaillierte Informationen zu den Proben des MUC Validierungssets und NBB graue/weiße Substanz Set

Kohorte	Paar	Diagnose	Geschlecht	Alter [Jahre]	Braak Stadium	APOE	post-mortem Zeit [Stunden]	Gewebe / Gehirnregion
MUC Validierungsset	MUC 1	CTRL	F	75	III-IV	33	24	frontaler und temporaler Kortex
		AD	F	75	VI	33	< 12	frontaler und temporaler Kortex
	MUC 2	CTRL	F	76	III-IV	33	26	frontaler und temporaler Kortex
		AD	F	76	V-VI	44	24	frontaler und temporaler Kortex
	MUC 3	CTRL	F	80	III-IV	33	NA	frontaler und temporaler Kortex
		AD	F	80	V	33	> 48	frontaler und temporaler Kortex
	MUC 4	CTRL	M	87	I-II	23	48	frontaler und temporaler Kortex
		AD	M	87	V	34	26	frontaler und temporaler Kortex
	MUC 5	CTRL	F	88	I-II	33	> 48	frontaler und temporaler Kortex
		AD	F	88	VI	33	39	frontaler und temporaler Kortex
	MUC 6	CTRL	M	63	I	33	18	frontaler und temporaler Kortex
		AD	M	62	VI	33	NA	frontaler und temporaler Kortex
	MUC 7	CTRL	M	75	II	34	27	frontaler und temporaler Kortex
		AD	M	74	V-VI	33	50	frontaler und temporaler Kortex
	MUC 8	CTRL	F	83	II	33	22	frontaler und temporaler Kortex
		AD	F	82	V-VI	34	14	frontaler und temporaler Kortex
NBB graue/weiße Substanz Set	NBB 1	CTRL	F	78	I	33	5	cingulate gyrus
		AD	F	75	IV	33	4	cingulate gyrus
	NBB 2	CTRL	F	82	I	33	7	cingulate gyrus
		AD	F	77	V	33	6	cingulate gyrus
	NBB 3	CTRL	F	77	I	33	6	inferior frontal gyrus
		AD	F	77	V	33	4	inferior frontal gyrus
	NBB 4	CTRL	F	82	I	32	6	inferior frontal gyrus
		AD	F	80	VI	33	7	inferior frontal gyrus
	NBB 5	CTRL	F	91	I	22	6	inferior frontal gyrus
		AD	F	93	IV	33	7	inferior frontal gyrus
	NBB 6	CTRL	F	89	II	32	7	medial frontal gyrus
		AD	F	88	V	33	7	medial frontal gyrus
	NBB 7	CTRL	F	92	I	32	7	medial frontal gyrus
		AD	F	93	IV	32	3	medial frontal gyrus
	NBB 8	CTRL	F	90	I	22	7	superior frontal gyrus
		AD	F	95	V	33	5	superior frontal gyrus



2.11. Mauslinien und murine Gehirngewebe

2.11.1. Wildtyp-Mäuse

C57BL/6J Wildtyp-Mäuse ist die wohl bekannteste Sublinie der ursprünglich 1921 von C.C. Little etablierten Inzucht-Mauslinie. Die von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jörn Walter (AG Genetik/Epigenetik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken) bereitgestellten Tiere wurden in der vorliegenden Arbeit aufgrund ihres genetischen Hintergrundes als kognitiv gesunde Kontrollen verwendet.

2.11.2. Triple-transgenes Alzheimer-Mausmodell (3xTg)

Ein Pärchen des von Frank LaFerla an der University of California, Irvine (UCI) auf einem gemischten genetischen Hintergrund (C7BL/6;129X1/SvJ;129S1/Sv) gezüchteten, triple-transgenen Alzheimer-Mausmodells (3xTg-AD; LaFerla; (PS1_{M146V};Thy1.2-APP_{swe}; Thy1.2-tau_{P301L})) wurde von LaFerla bezogen.

Dieses Alzheimer-Mausmodell trägt neben dem Knock-In für Presenilin1 mit PSEN1_{M146V}-Mutation auch ein Transgen für humanes APP mit schwedischer Mutation (APP_{KM670/671NL} auch APP_{swe}) sowie ein Transgen für humanes Tau mit MAPT_{P301L}-Mutation (Oddo et al., 2003). Die Überexpression der Transgene ist auf das zentrale Nervensystem beschränkt und führt dort zu einem dem Alzheimerphänotyp beim Menschen ähnlichen neuropathologischen Phänotyp. Die Tiere entwickeln bereits früh kognitive Defizite und synaptische Dysfunktionen (> 4 Monate), später manifestieren sich sowohl extrazelluläre Aβ-Plaques (> 6 Monate) als auch intrazelluläre Tau-Tangles (> 12 Monate).

Die miRNA Ergebnisse aus den Experimenten mit humanem Gehirngewebe sollten in einem Alzheimer-Mausmodell nachgestellt werden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Hippocampus und zerebralem Kortex von 3xTg und C57BL/6J im Alter zwischen 3 und 21 Monaten isoliert. Eine Übersicht zu Anzahl, Alter und Geschlecht der in diesem Experiment verwendeten Tiere findet sich in nachstehender Tabelle (Tab. 3).

Tab. 3: Tabellarische Übersicht zu Anzahl, Geschlecht und Alter der in der Studie verwendeten 3xTg und C57BL/6JMäusen

Mauslinie	Geschlecht	Alter in Monaten						
		3	6	9	12	15	18	21
C57BL/6J	Männchen	-	4	-	4	2	-	-
	Weibchen	4	-	5	2	-	3	-
3xTg	Männchen	3	1	2	1	4	3	2
	Weibchen	2	3	2	3	2	3	2



2.11.3. Gewebe aus APP23 und APP51 Mauslinien

Aus einer früheren Präparation zweier Alzheimer-Mausmodelle - APP23 und APP51 - standen in der Arbeitsgruppe noch Gehirngewebe zur Verfügung. Nähere Informationen zu Geschlecht und Alter sind nicht bekannt. Die Gesamt-RNA der Gewebe dient lediglich als Positivkontrolle bei der Genotypisierung der 3xTg Mäuse und wurde in keine weiteren Analysen einbezogen. In beiden Fällen handelt es sich um gut charakterisierte, weit verbreitete Mausmodelle mit starker APP Überexpression.

Die APP23 Maus ist ein gut charakterisiertes und weit verbreitetes Alzheimer-Mausmodell, bei welchen humanes APP (Isoform APP751) mit schwedischer Doppel-Mutation (KM670/671NL) unter neuro-spezifischem Thy1 Promotor exprimiert wird. Ab einem Alter von 3 Monaten zeichnen sich erste kognitive Defizite ab, im Alter von 6 Monaten bilden sich senile Plaques. Die Entstehung von Neurofibrillen bleibt jedoch aus (Sturchler-Pierrat et al., 1997). Das Mausmodell wurde gemeinsam von Wissenschaftlern von Novartis und der Universität Basel auf einem B6D2 Hintergrund entwickelt, aber inzwischen bereits seit über 20 Generationen mit C57BL6-Mäusen rückgekreuzt.

Das Mausmodell APP51 ebenfalls mit C57BL/6J zurückgekreuzt, exprimiert humanes wildtyp APP unter Kontrolle des neuronalen Thy1 Promotorelements. Die in Kooperation von der Mausfacility Novartis und Hertie Institute für klinische Gehirnforschung entwickelten Mäuse zeigen im Alter von 13-15 Monaten die ersten Plaques (Bodendorf et al., 2002).

2.12. Zell-Linien in der Zellkultur

Die verwendeten Zellen-Linien wurden über die „European Collection of Authenticated Cell Cultures“ (ECACC) und „American Type Culture Collection“ (ATCC) bezogen.

2.12.1. HEK293T

HEK293T ist einer der bekanntesten Derivate der 1977 von Graham *et al.* etablierten HEK293 Zelllinie, mit zusätzlichem SV40 T-Antigen, welches ein stabileres Wachstum und stärkere Adhärenz bewirkt (Rio *et al.*, 1985; DuBridge *et al.*, 1987). Es handelt sich um eine adhärenz wachsende Zelllinie aus humane, embryonale Nierenzellen (*engl.*: human embryonic kidney) mit leicht rundlicher, epithelzellenähnlicher Morphologie. HEK293T Zellen lassen sich mit hoher Effizienz transfizieren. Das Stammkulturmedium besteht aus einer Mischung von DMEM und F12 (Verhältnis 1:1) und enthält 10% FCS.

2.12.2. SH-SY5Y

SH-SY5Y ist eine dreifach klonierte Subzelllinie einer humanen Neuroblastoma Zell-Linie aus dem Knochenmark (SK-N-SH). Diese 1970 von JL Biedler *et al.* etablierte Zelllinie ist eine Mischkultur aus überwiegend adhärenz und im Medium flotierenden Zellen. Die neuroblastenähnlichen Zellen weisen feine Zellauswüchse (Neuriten) auf, verlieren diesen neuronalen Charakter aber mit höheren Passagen und nehmen dann häufig eine eher epithelzellenähnliche Morphologie an. Das Stammkulturmedium besteht aus DMEM und 10% FCS.



2.13. Bakterien für die Transformation

2.13.1. One Shot TOP10 E.coli

OneShot TOP10 sind chemisch kompetente *E.coli* (Invitrogen, C404003), welche für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Hitzeschocktransformation verwendet werden. Nachfolgend ist der Genotyp der Bakterienzellen aufgeführt:

F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara**leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*

2.14. Plasmide

Zur Manipulation des miR-132/212 Clusters in der Zellkultur, wurde eukaryotische Zellen mit verschiedenen Plasmiden transfiziert, die entweder zur Überexpression der betreffenden miRNA führen (Precursor) oder ein zu ihnen komplementäres Produkt erzeugen um sie aus dem miRNA Pool der Zelle zu entfernen (Inhibitor Sequenz). Parallel wurde auch ein Kontrollplasmid transfiziert, um zu zeigen, dass das Plasmid selbst keine Effekte hervorruft (scrambled). Die Plasmide wurden bei der Firma GeneCopoeia (GeneCopoeia, 9620 Medical Center Dr. Suite 101 Rockville, MD 20850 USA) käuflich erworben.

Alle kodieren ein Resistenzgen für Ampicillin zur Selektion nach der Transformation in Bakterien und ein Resistenzgen für Puromycin zur Selektion nach der Transfektion in eukaryotische Zellen. Außerdem kodieren die Plasmide ein grün (eGFP) bzw. rotfluoreszierendes (mCherry) Reportergen, welches zur Überprüfung der Transfektion unter einem Fluoreszenzmikroskop genutzt wurde.

Die verwendeten Plasmide sind nachfolgend tabellarisch zusammengefasst und die zugehörigen Plasmidkarten für Precursor und Inhibitor-Sequenz sind in Abb. 9 dargestellt.

Plasmid Name	Backbone	Insert	Promotor	Reporter Gene
HmiR-AN0161-AM01	pAZX-AM01	Hs-miR132-3p Inhibitor Sequenz	H1	mCherry
HmiR-AN0319-AM01	pAZX-AM01	Hs-miR212-3p Inhibitor Sequenz	H1	mCherry
HmiR0268-MR04	pEZX-MR04	Hs-miR132 Precursor	CMV	eGFP
HmiR0269-MR04	pEZX-MR04	Hs-miR212 Precursor	CMV	eGFP
CmiR0001-MR04	pEZX-MR04	miRNA scrambled control	CMV	eGFP

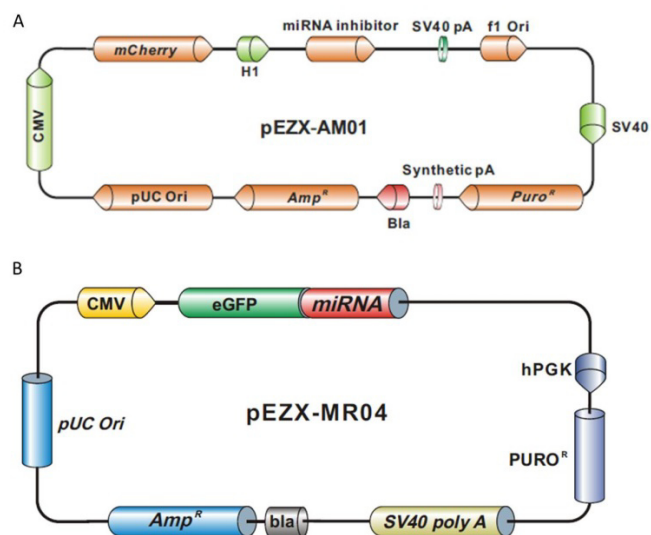


Abb. 9: Plasmidkarten der verwendeten Plasmide

Von der Firma GeneCopoeia bereitgestellte Plasmidkarten für (A) ein Plasmid, welches für eine Inhibitor-Sequenz und mCherry kodiert und (B) Plasmid, welches die Precursor miRNA und eGFP kodiert

3. METHODEN

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Ribonukleinsäure-Extraktion aus Gehirngewebe und Zellpellets

Ribonukleinsäure (RNA) wurde unter Verwendung entsprechender Reaktionskits der Firma Qiagen aus humanem und murinem Gehirngewebe, sowie humanen Zell-Linien extrahiert.

Bei den eingesetzten Reaktionskits der Firma Qiagen miRNeasy Mini Kit (•) und RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (◊) wird die organische Nukleinsäure-Extraktion mit Phenol/Guanidin-Thiocyanat (QIAzol) kombiniert, dessen chaotrope Eigenschaft die Lyse lipidreicher Gewebe, wie beispielsweise Gehirn, erleichtert und gleichzeitig RNasen deaktiviert. Während die in der Zwei-Phasen-Extraktion freigesetzten Nukleinsäuren - RNA und DNA - an die Silika-Membran binden, werden Verunreinigungen mittels verschiedener Puffer von der Säule gewaschen.

Das RNeasy Lipid Tissue Mini Kit reinigt RNAs > 200 nt auf, wohingegen mit dem miRNeasy Mini Kit auch kürzere RNAs (> 18 nt), wie beispielsweise microRNAs eluiert werden. Die Durchführung der RNA-Extraktion erfolgte entsprechend der Herstellerangaben, wobei alle Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt wurden.

Humane Gehirngewebe wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in 0,5-1 ml RNALater (Qiagen) gelagert und zur Extraktion schließlich in 700 µl QIAzol überführt. Murine Gewebe und Pellets humaner Zell-Linien wurden direkt in 500 µl QIAzol aufgenommen. Es wurde in allen Präparationen darauf geachtet die maximale Säulenkapazität nicht zu überschreiten (max. 90 mg/Säule; 1×10^7 Zellen). Die Homogenisation erfolgte im Allgemeinen von Hand mittels Mikropistillen und Kanülen (0,9 x 70 mm und 0,6 x 25 mm). Alternativ wurde das Gewebe mit QIAzol versetzt in einem mit Aufschlusskügelchen gefüllten 2 ml Reagiergefäß (0,14 mm Keramik CK14, Peqlab) im Precellys®24 Homogenisator je zweimal 10 Sekunden mit 5500 rpm und 5 Sekunden Pause homogenisiert, abzentrifugiert und in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Die nachfolgende Tabelle (Tab. 4) bietet eine Übersicht über die durchgeführten RNA-Extraktionen.

Tab. 4: Übersichtstabelle zu den durchgeführten RNA-Extraktionen

Reaktionskit	Homogenisationsmethode	Kollektiv	Gewebe
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (> 200 nt)	Mikropistille/Kanüle	MUC (HT12v4)	Temporaler Kortex
			Frontaler Kortex
	Precellys®24	MUC Kohorte	Temporaler Kortex
		MUC Validierungsset	Frontaler Kortex
miRNeasy Mini Kit (> 18 nt)	Mikropistille/Kanüle	NBB Validierungsset	Frontaler Kortex
		NBB graue/weiße Substanz	Frontaler Kortex
		Maus: C57BL/6J + 3xTg	diverse Gehirnregionen (z.B. Kortex, Hippocampus)
		Zellen: SHSY5Y + HEK293T	Wildtyp + transfiziert

Die Nukleinsäure-Extraktion erfolgte im Wesentlichen entsprechend der Herstellerangaben. Eine Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur führt zur Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe.

Nach Zugabe von [• 140 µl bzw. ◊ 200 µl] Trichlormethan/Chloroform (Rotipuran® p.a., Roth) wurde das Gemisch 15 Sekunden kräftig geschüttelt und anschließend für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.



Nach einer weiteren Inkubation von 2-3 Minuten auf Eis wurden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (• 10000 rpm bzw. ◊ 13000 rpm) und anschließend kurz auf Eis abgekühlt. Aufgrund der unterschiedlichen Löslichkeit in Phenol-Chloroform entstanden zwei durch eine weiße, stabile Interphase getrennte Schichten: eine organische, rötliche Phase (untere), sowie eine wässrige, klare (obere) Phase. Die wässrige Phase, welche die RNA enthält (• 350 µl bzw. ◊ 550 µl), wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit • 1,5 Volumen absolutem Ethanol bzw. ◊ 1 Volumen 70% - igem Ethanol versetzt und gemischt bis die Lösung schlierenfrei war. Maximal 700 µl diesen Gemischs wurden auf einmal auf eine Säule geladen und 15 Sekunden bei Raumtemperatur abzentrifugiert (• 12000 rpm bzw. ◊ 10000 rpm). Um die Ausbeute zu erhöhen wurde der Durchfluss ein zweites Mal auf die Säule pipettiert und erneut abzentrifugiert. Dies wurde mit dem restlichen Probenmaterial sukzessive wiederholt. Hierbei binden die Nukleinsäuren an die Silika-Membran und der Durchfluss kann separat entsorgt werden. Durch Zugabe von • 350 µl RWT bzw. ◊ RW1 Puffer und anschließender 15 sekundiger Zentrifugation bei Raumtemperatur (• 12000 rpm bzw. ◊ 10000 rpm), wurden unerwünschte Substanzen von der Säule gewaschen.

Aufgrund des störenden Einflusses von DNA in Folge-Experimenten wie beispielsweise der semi-quantitativen real time PCR, wurde eine DNaseI-Behandlung (RNase-freies DNase Set von Qiagen, Cat. No. 79254) zum enzymatischen Verdau der DNA analog der Herstellerangaben direkt auf der Silika-Membran durchgeführt. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die DNA-Fragmente mittels 350 µl • RWT bzw. ◊ RW1 Puffer und 15 sekundiger Zentrifugation (• 12000 rpm bzw. ◊ 10000 rpm) bei Raumtemperatur von der Säule gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 500 µl RPE Puffer versetzt und bei Raumtemperatur für 15 Sekunden (• 12000 rpm bzw. ◊ 10000 rpm) abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen. Dieser Schritt wurde mit weiteren 500 µl RPE Puffer wiederholt. Im Anschluss wurde eine Minute bei Raumtemperatur (• max. Geschwindigkeit bzw. ◊ 10000 rpm) zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues 1,5 ml Reagiergefäß gesteckt und mit 30 µl RNase-freiem Wasser beladen. Während der 5-10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA aus dem Säulenmaterial gelöst und durch Zentrifugation mit 10000 rpm bei Raumtemperatur eluiert. Die RNA-Extrakte wurden bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.1.2. Extraktion genomischer DNA aus Mausschwanz

Die Präparation genomischer DNA erfolgte entsprechend eines laboreigenen Protokolls.

Hierzu wurde 2xLysepuffer frisch mit ddH₂O im Verhältnis 1:1 gemischt und mit 100 µg/ml Proteinase K (Stock: 10 mg/µl) versetzt. Die Mausschwanzspitze (~ 0,5 cm) wurde mit 500 µl dieser Lösung überdeckt und bei 55°C und 400rpm im Thermoschüttler bis zur vollständigen Lyse (über Nacht) inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Lysat für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit 500 µl Isopropanol versetzt. Durch vorsichtiges invertieren wurde die DNA gefällt. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 Minuten wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend wieder bei 13000rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgenommen und das Pellet bei 37°C im Thermoblock getrocknet. Die gDNA wurde dann in 50µl 1xTE über Nacht bei 4 °C gelöst.



3.1.3. Konzentrationsbestimmung und Qualitätsanalyse von Nukleinsäuren

3.1.3.1. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäure-Extrakten lassen sich photometrisch über die Absorption bei den Wellenlängen von 260 nm bzw. 280 nm bestimmen. Die Konzentration ergibt sich aus der optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}), welche charakteristisch für Nukleotide ist. Eine OD_{260} von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA (dsDNA) einer Konzentration von etwa 50 ng/μl, bei einzelsträngiger RNA (ssRNA) einer Konzentration von 40 ng/μl. Die OD bei 280 nm Wellenlänge liefert Informationen über etwaige Kontaminationen durch Proteine oder Phenol. So lässt sich neben der Konzentration über das Verhältnis der $OD_{260/280}$ auch die Qualität der Nukleinsäure ermitteln. Der Quotient sollte für RNA zwischen 1,9 und 2,1 und für DNA zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Weitere Verunreinigungen, wie beispielsweise durch Guanidinthiocyanat, ließen sich bei 230 nm detektieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die photometrische Bestimmung von Nukleinsäure-Konzentration und Qualität mit je 2 μl unverdünntem Nukleinsäure-Extrakt gegen 2 μl des entsprechenden Diluenten (RNA: RNase-freies Wasser; DNA: 1xTE) auf der NanoQuant-Platte im Spektralphotometer Infinite[®] 200 NanoQuant der Firma Tecan durchgeführt. Dabei ermöglichen die 16 kleinen Quarz-Vertiefungen der NanoQuant-Platte eine Messung der Proben ohne Eigenabsorption im UV-Bereich. Sowohl OD-Ratio als Maß für die Qualität, als auch die Konzentration in ng/μl werden automatisch von der zugehörigen Geräte-Software i-Control[™] kalkuliert und als Tabelle ausgegeben.

Die Messung ist jedoch fehlerbehaftet für den Fall, dass der zu messende Nukleinsäure-Extrakt degradiert ist oder Verunreinigungen der jeweils anderen Nukleinsäure enthält. Da die beschriebene Methode diese Unterscheidung nicht leisten kann, wurden die Nukleinsäuren stets auch gelelektrophoretisch aufgetrennt.

3.1.3.2. Gelelektrophorese

Die Methode der Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten nach ihrer Größe im elektrischen Feld innerhalb einer Trägermatrix (Agarose). Dabei reguliert der prozentuale Anteil an Agarose die Porengröße. Je hochprozentiger das Gel desto besser lassen sich kürzere Fragmente auftrennen. Die angelegte Spannung beeinflusst die Laufgeschwindigkeit der negativ geladenen Nukleinsäure zur Anode, wobei lange Nukleinsäurefragmente langsamer durch die Trägermatrix wandern als kürzere. Neben den mit 6 x Ladepuffer versetzten Proben wird zum Vergleich der Fragmentlängen zusätzlich ein entsprechender Größenstandard aufgetragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden standardmäßig 1-2%-ige Agarose-Gele in 1 x TBE verwendet und die Fragmente bei 90-120 Volt aufgetrennt. Für ein 1%-iges Gel wurden 1g LE-Agarose (Biozym) mit 100 ml 1xTBE und aufgekocht bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Nach kurzer Abkühlzeit wurde die Gel-Masse in einen Gelschlitten gegossen, Kämme zur Erzeugung von Taschen für die aufzutragenden Proben eingesetzt und das Gel zur Aushärtung inkubiert. Das Agarose-Gel wurde dann in eine mit Laufpuffer aus 1xTBE gefüllte Gelkammer eingesetzt, so dass es vollständig mit Flüssigkeit bedeckt war. Nach Entfernung der Kämme wurden die mit 6xProbenpuffer versehenen Nukleinsäure-Extrakte in die Taschen pipettiert.

Durch Zugabe eines interkalierenden Agens - GelRed, ähnlich des Ethidiumbromids - zu den Proben vor der gelelektrophoretischen Auftrennung oder durch Einlegen des gesamten Agarosegels in ein Färbebad wurden die Fragmente auf einem Transilluminator (BioView, Biostep, Billerica, MA, USA) mittels Digitalkamera unter UV-Licht dokumentiert.

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nur zur Auftrennung von gDNA und PCR-Produkten, sondern auch zur groben Beurteilung der RNA-Qualität verwendet. Hierbei wurden lediglich die Bandenstärken der beiden großen ribosomalen Untereinheiten - 28S und 18S rRNA – betrachtet. Bei guter Qualität sollten zwei distinkte Banden zu sehen sein, deren obere Bande stärker erscheint als die untere. Liegt dieses Verhältnis (28S/18S) unter einem Wert von 2, lassen sich bereits zusätzliche Banden oder gar ein Schmier erkennen, ist davon auszugehen, dass die RNA bereits degradiert ist.

3.1.3.3. Bestimmung des RIN-Wertes (RNA Integrity Number) im Bioanalyzer

RNAs sind empfindlich gegenüber ubiquitär vorkommenden RNasen, welche zur Degradation der Ribonukleinsäuren führen. Dieser Abbauprozess beeinflusst insbesondere die Ergebnisse von Gen-Expressionsanalysen, so dass der Bestimmung der RNA-Integrität eine große Bedeutung zukommt. Die OD Ratio der photometrischen Messung reicht nicht aus, da hier zum Einen RNA und DNA nicht voneinander getrennt betrachtet werden können und zum Anderen sogar einzelne Nukleotide bei 260nm absorbieren und so die Messwerte fälschlicherweise erhöhen. Zudem wird die Messung bei geringen Nukleinsäuremengen unzuverlässig. In der Gelelektrophorese lässt sich zwar die Ratio aus 28S und 18S ribosomaler RNA bestimmen, was lange Zeit als Maß für die RNA-Integrität verwendet wurde, jedoch ist dieser Wert durch die subjektive Beurteilung relativ inkonsistent. Eine Alternative bietet die Lab-on-a-Chip Technologie von Agilent, bei der RNA über Mikrokapillaren elektrophoretisch separiert wird.

Das Mikrokapillarsystem des Chips wurde mit einer Mischung aus Gelmatrix und Fluoreszenzfarbstoff gefüllt und anschließend mit RNA-Proben beladen. Dabei interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff in die RNA, welche durch die angelegte Spannung durch die Mikrokapillaren transportiert und so, ähnlich einer einfachen Gelelektrophorese, der Größe nach aufgetrennt wird. Die einzelnen fluoreszenzmarkierten Fragmente werden mittels laserinduzierter Fluoreszenzdetektion gemessen und die Daten gegen die Zeitachse aufgetragen (Peaks). Auf diese Weise generiert die zugehörige Agilent 2100 Expert Software ein Elektropherogramm - ähnlich eines Chromatogramms -, welches dann in ein gel-ähnliches Bild umgewandelt wird (Abb. 10). Die Höhen und Flächen bestimmter Peaks dienen der Berechnung des so genannten RIN-Wertes (RNA Integrity Number) der Probe durch einen eigens hierfür von der Firma Agilent entwickelten Algorithmus. Dieser Algorithmus basiert zwar auch auf dem Verhältnis der ribosomalen RNAs (28S/18S) bezieht aber weitere Datenpunkte aus unterschiedlichen Regionen des Elektropherogramms in die Kalkulation mit ein (Mueller, Lightfoot, & Andreas Schroeder, 2016).

Der RIN-Wert gilt demnach als Maß der Integrität isolierter RNA mit einer Skala von 1 bis 10. Je höher der RIN-Wert desto qualitativ hochwertiger die RNA, je niedriger desto höher der Degradationsgrad der RNA.



Die Bestimmung der RIN-Werte erfolgte mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit auf dem Bioanalyzer 2100 Expert (Eukaryotic Total RNA) entsprechend der Vorgaben des Herstellers. Angewandt wurde diese Methode auf die mit RNeasy Lipid (Qiagen) präparierten Gesamt-RNAs der temporalen und präfrontalen Kortex der MUC Kohorte. Die beobachteten RIN-Werte lagen im für post-mortem Gehirngewebe laut Literatur zu erwartenden Bereich (Lukiw, Andreeva, Grigorenko, & Rogaev, 2012).

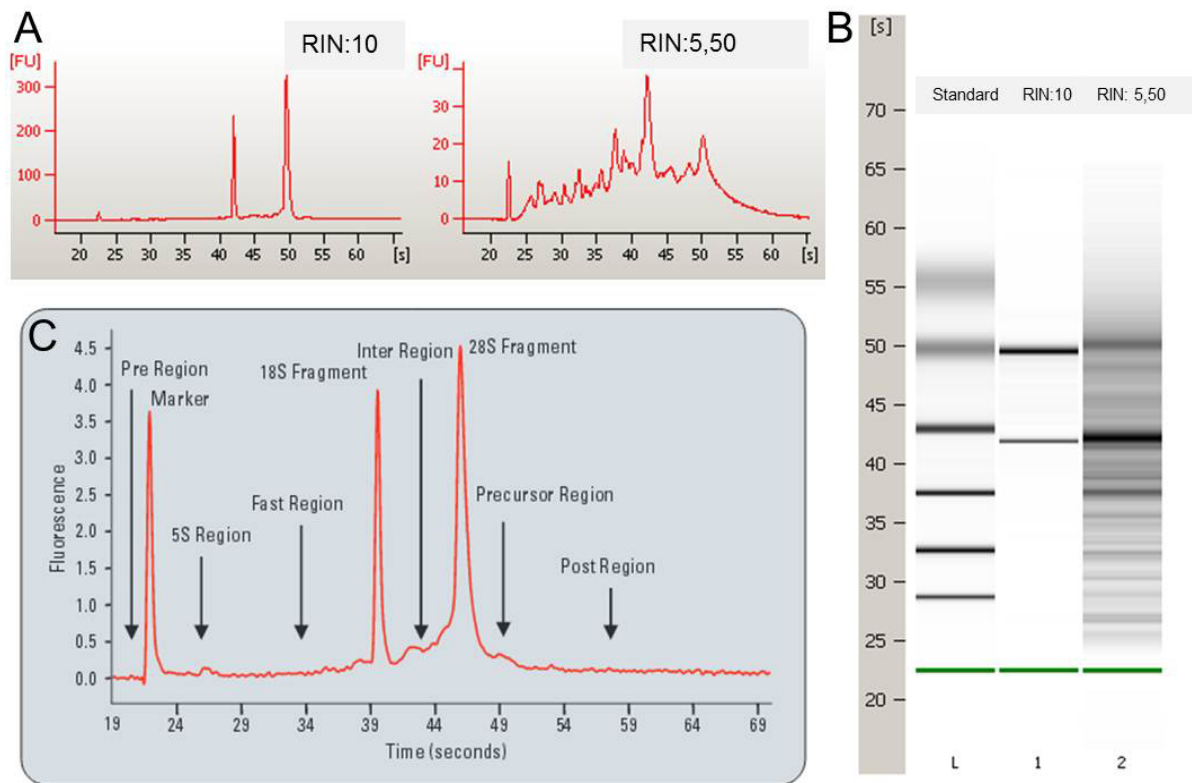


Abb. 10: Graphisch dargestellte Ergebnisse eines Bioanalyzer-Laufs

Von der Agilent 2100 Expert Software graphisch aufbereitete Elektropherogramme (A links) einer Probe mit maximalem RIN und (A rechts) einer Probe bei der bereits ein Teil der RNA degradiert vorliegt sowie (B) das zu diesen Proben zugehörige elektronisch generierte Gelbild inklusive Größenstandard. Abbildung (C) erklärt die einzelnen Elektropherogramm-Peaks einer qualitativ hochwertigen RNA Probe

3.1.4. Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, *kurz*: PCR) handelt es sich um eine *in vitro* Methode zur spezifischen Amplifikation von ausgewählten DNA-Abschnitten. Die Methode basiert prinzipiell auf der Denaturierung einer doppelsträngigen DNA-Matrize durch Erhitzen auf 92-96°C, dem Anlagern der spezifisch zum DNA-Abschnitt komplementären Oligonukleotide (= Annealing) durch Absenken der Temperatur auf die spezifische Schmelztemperatur der Oligonukleotide und anschließender Elongation ebendieser durch eine Polymerase bei 72 °C.

Ein einfacher PCR-Ansatz enthält neben dem Template (DNA) und den spezifischen Oligonukleotiden (Forward (For)/Reverse (Rev) Primer), eine Polymerase, Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs), Magnesiumchlorid und doppelt deionisiertes Wasser (ddH₂O). Während des Annealings binden die Primer an die gewünschten Positionen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Die Polymerase, ein katalytisches hitzestabiles Enzym, verlängert die Primer in 3' zu 5' Richtung, indem sie diese um entsprechend komplementäre dNTPs ergänzt. Einige Polymerasen gehören zur Gruppe der Hot-Start Enzyme, welche vor Beginn der eigentlichen Reaktion

eine gewisse Aktivierungstemperatur benötigen. Mehrere Zyklen (>35) aus Denaturierung, Annealing und Elongation führen schließlich zu Produkten mit durch Oligonukleotiden begrenzter Länge und damit zur exponentiellen Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnitts. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler (ABI 9700 GeneAmp, Applied Biosystems) durchgeführt, der für die nötige Temperaturregulation sorgt. Das Gelingen der einzelnen Polymerase-Kettenreaktionen wurde auf Agarose-Gelen überprüft.

3.1.5. Genotypisierung 3xTg Mäuse für PSEN1 Mutation

3.1.5.1. Amplifikation von PSEN1

Zur Genotypisierung triple-transgener Mäuse (3xTg) wurden humanes Amyloid-Vorläuferprotein (APP) und Presenilin1 (PS1) amplifiziert. Die entsprechenden Oligonukleotide wurden nach den Angaben des Jackson Labors (www.jax.org) zur Genotypisierung von 3xTg Mäuse bei der Firma Metabion bestellt (entsalzt; MassChecked MALDI; 0,04 µmol; gelöst 100µM):

For_PSEN1: AGGCAGGAAGATCACGTGTTCAAGTAC

Rev_PSEN1: CACACGCACACTCTGACATGCACAGGC

PSEN1 (Qiagen Reagenzien)	Volumen/rxn
10xPuffer	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,4 µl
dNTPs(2,5mM each)	0,2 µl
For_PSEN1 (20µM)	1 µl
Rev_PSEN1 (20µM)	1 µl
HotStar Taq	0,2 µl
RNasefreies Wasser (Lonza)	12,2 µl
gDNA (100ng/µl)	1 µl
Endvolumen	19 µl
Produktlänge (bp)	530 bp

Thermocycler- Programm:	15min - 95°C	
	30sek - 95°C	
	30sek - 69°C	20x
	60sek - 72°C	
	30sek - 95°C	
	30sek - 65°C	20x
	60sek - 72°C	
	10min - 72°C	
	∞ 4°C	

Um das Vorhandensein der Mutation in PSEN1 zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

3.1.5.2. PSEN1 Restriktion

Die Restriktion wurde zum sequenzspezifischen Verdau von PCR-Produkten mittels ausgewählter Restriktionsendonukleasen und dazu passenden Puffern eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Restriktion zum Nachweis der PS1-Mutation in 3xTg Mäusen entsprechend des nachfolgenden Protokolls durchgeführt:



Reagenz	Volumen/rxn
PCR Produkt	6 µl
10xNEB Buffer3	1,2 µl
BSA (10 mg/µl)	0,12 µl
BstEII (10 ⁴ U/ml)	1 µl
ddH ₂ O	3,68 µl
Endvolumen	20 µl

Der Restriktionsansatz wurde anschließend 2 Stunden bei 60°C inkubiert und der Verdau zur Überprüfung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei sollte bei den C57BL/6J Mäusen keine Fragmente entstehen, das PCR Produkt von 530 bp also erhalten bleiben (homozygot PSEN1-Wildtyp). Die triple-transgenen sollten eine mutierte PSEN1 Variante tragen, die sich durch BstEII schneiden lässt. Hier waren zwei Fragmente von 350 bp und 180 bp zu beobachten.

Die Sequenz bei der BstEII schneidet ist nachfolgend dargestellt:

5'...GGTNACC...3'
3'...CCANTGG...5'

Quelle: <https://www.neb.com/products/r0162-bsteii>

3.1.6. Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ist die Umkehrung der Transkription bei der unter Verwendung kurzer Oligonukleotidsequenzen und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der reversen Transkriptase, RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden kann. Die cDNA entspricht im Wesentlichen der Sequenz der genomischen DNA ohne Introns. Der Reaktionsansatz besteht im Allgemeinen aus RNA einer fest eingestellten Konzentration, einem Puffer, reverse Transkriptase, dNTPs, Nuklease freiem Wasser und entsprechenden Oligonukleotiden. Soll mRNA in cDNA umgeschrieben werden, werden so genannte „random Hexamere“ oder „Oligo(dT)“ Primer genutzt. Bei random Hexameren handelt es sich um eine Vielzahl unterschiedlicher Oligonukleotide aus 6 zufällig aneinandergereihten Nukleotiden, die an komplementäre Sequenzen der RNA binden und so das gesamte mRNA-Spektrum erfassen. Oligo(dT) Primer hingegen bestehen auch einer langen T-Sequenz die komplementär zu den für mRNAs charakteristischen polyA-Enden ist. Da microRNAs einerseits sehr viel kürzer sind und andererseits kein polyA-Ende aufweisen, werden diese unter Verwendung sequenzspezifischer RT-Primer mit einer stem-loop Struktur am 3' Ende in cDNA umgeschrieben. Durch die reverse Transkription wird nur die eingesetzte Menge mRNA bzw. miRNA in cDNA umgewandelt, nicht aber amplifiziert. Somit wird gewährleistet, dass alle Transkripte gleichmäßig umgeschrieben werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden der High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) zur cDNA Synthese von mRNAs und der TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) zur cDNA Synthese von microRNAs verwendet. Die Durchführung erfolgte in beiden Fällen gemäß Herstellerangaben. Nachfolgend sind die verwendeten Protokolle tabellarisch zusammengefasst.

3.1.6.1. High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Umschreiben von mRNA in cDNA mittels random Hexameren zur Genotypisierung von humanem APP und humanem MAPT in transgenen Mausmodellen:

Reagenzien	1 rxn	RT (-)	H ₂ O
10xPuffer	2 µl	2 µl	2 µl
25xdNTPs	5,6 µl	5,6 µl	5,6 µl
10xPrimer	0,8 µl	0,8 µl	0,8 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl	-	1 µl
RNase free H ₂ O	4,2 µl	5,2 µl	14,2 µl
Volumen RT-Mix	10 µl	10 µl	10 µl
RNA 50 ng/µl	10 µl	10 µl	-
Thermocycler-Programm:	25°C	10 min	
	37°C	120 min	
	85°C	5 min	
	4°C	∞	

3.1.6.2. TaqMan MicroRNA Reverse Transkription Kit

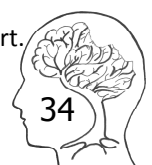
Umschreiben von microRNA in cDNA mittels sequenz-spezifischer stem-loop RT-Primer (Applied Biosystems) zur Expressionsanalyse von miRNAs:

Reagenzien	1 rxn	RT (-)	H ₂ O
10xPuffer	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
dNTPs (100mM)	0,15 µl	0,15 µl	0,15 µl
RT-Primer	3 µl	3 µl	3 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl	-	1 µl
Rnase Inhibitor	0,19 µl	0,19 µl	0,19 µl
RNase free H ₂ O	4,16 µl	4,16 µl	4,16 µl
Volumen RT-Mix	10 µl	10 µl	10 µl
RNA 2 ng/µl	5 µl	5 µl	-
Thermocycler-Programm:	16°C	30 min	
	42°C	30 min	
	85°C	5 min	
	4°C	∞	

Eine Liste aller für die Reverse Transkription von miRNAs genutzten spezifischen RT-Primer ist unter Abschnitt 2.7 des Materialteils zusammengestellt. Die so synthetisierte cDNA dient als Ausgangsmaterial von Expressionsanalysen via real time PCR mittels TaqMan Assays.

3.1.7. Semiquantitative real time PCR (sqPCR)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Polymerasekettenreaktion bei der nicht nur die Entstehung des PCR Produktes überprüft sondern dessen Amplifikation durch Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffes in Echtzeit verfolgt werden kann. Dabei gilt je mehr amplifiziertes Produkt entsteht desto stärker die Fluoreszenz. Die sqPCR wird mittels spezifischer stem-loop RT-Primer für miRNAs während deren reverse Transkription hergestellte cDNA bzw. die cDNAs der reversen Transkription von mRNAs werden mit sequenzspezifischen Oligonukleotidsonden, welche in der Sequenz zwischen Forward und Reverse Primer binden, durchgeführt.



Die von Applied Biosystems speziell für jedes Zielgen spezifisch entwickelten TaqMan Assays bzw. TaqMan miRNA Assays beinhalten sowohl die Oligonukleotidsonde als auch Forward und Reverse Primer in entsprechendem Verhältnis zum direkten Einsatz in die Real Time PCR.

Am 5' Ende der Oligonukleotidsonde ist der Fluoreszenzstoff (FAM oder VIC) als Reporter positioniert, während am 3' Ende der Sonde ein Minor groove binder (MGB) und ein Quencher angebracht sind.

Durch die räumliche Nähe des Quenchers zum Reporter wird das Fluoreszenzsignal unterdrückt, da sich Emissionswellenlänge des Reporters und Anregungswellenlänge des Quenchers entsprechen. Dieses Phänomen ist auch als Förster- Energieresonanztransfer (*kurz: FRET*) bekannt. Während der PCR Reaktion wird die Sonde durch die Polymeraseaktivität vom 5' Ende her abgebaut und so die räumliche Nähe von Reporter und Quencher aufgelöst, so dass das Fluoreszenzsignal nicht mehr durch den Energieresonanztransfer unterdrückt werden kann (Abb. 11).

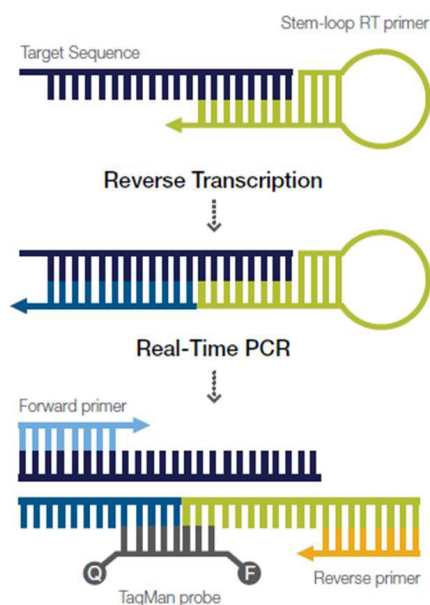


Abb. 11: Schematische Darstellung von Reverse Transkription und real time PCR miRNA TaqMan Assay

Quelle: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9854-CO020249-TS-rebrand-TaqMan-comprehensive-microRNA-Broch-Corp-FLR.pdf>

Das detektierte Fluoreszenzsignal ist dabei proportional zur Produktmenge.

Die Software des real time Cyclers generiert aus den einzelnen Fluoreszenzsignalen für jede Probe eine Kurve. Diese steigt über die Anzahl der Zyklen exponentiell an (Exponentialphase) bis sie schließlich ihr Maximum (Plateau) erreicht. Der für die Berechnungen relevante Wert ist Cycle Threshold (Ct-Wert). Dieser ist definiert als der PCR-Zyklus bei dem das Fluoreszenzsignal der Probe das des Hintergrundsignals übersteigt (Abb. 12).

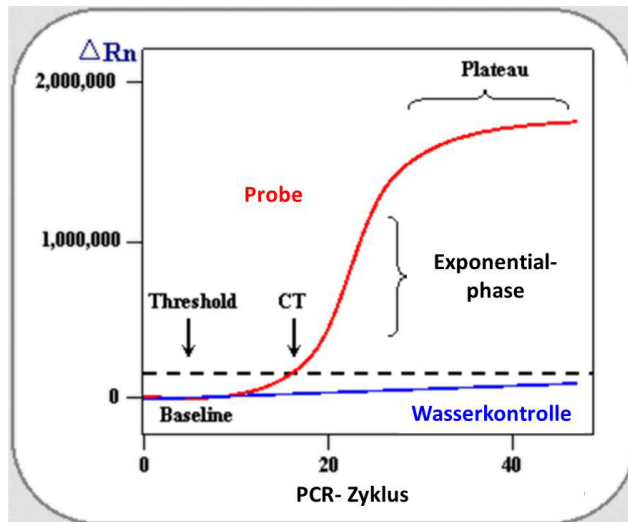


Abb. 12: Bestimmung des Ct-Wertes.

Der Ct-Wert (Threshold Cycle) definiert den PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal der Amplifikate das Hintergrundsignal überschreitet
 R_n = normalisiertes Reportersignal (Referenzfluoreszenz (ROX)/FAM-Signal)

Verändert nach: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/IMG/PCR_plot.gif

Analysiert man parallel zu den Proben eine Standardkurve und gleicht die Fluoreszenzsignale der Proben mit denen der Standardkurve ab, lassen sich in der real time PCR sogar Kopienzahl bzw. Konzentration des spezifischen Produkts bestimmen. Man spricht dann von einer absoluten Quantifizierung.

Für die vorliegende Arbeit war eine relative Quantifizierung ausreichend. Bei dieser Variante werden in den Proben nicht nur Fluoreszenzsignale der zu untersuchenden Produkte (Zielgene) sondern auch Signale eines über alle Proben konstant exprimierten Gens (endogene Kontrolle) gemessen. Die endogene wird zur Normalisierung der Probe verwendet:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{endo.Kontrolle}}$$

Die so normalisierten Signale Proben mit AD Hintergrund werden anschließend in Relation zu denen der gesunden Kontrollproben gesetzt und so der Expressionsunterschied berechnet.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{AD}} - \Delta Ct_{\text{CTRL}}$$

Zusätzlich lässt sich die Veränderung der Expression als sogenannter Fold Change ausdrücken:

$$\text{fold} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Die gesamte Analyse erfolgte gemäß der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Delta-Delta-CT) Methode analog der oben aufgeführten Formeln.

In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Datenpunkte in Duplikaten gemessen und die Ct-Werte zu Beginn der Analyse gemittelt. Zusätzlich wurde für alle gemessenen Zielgene eine Wasserkontrolle mitanalysiert (PCR Ansatz ohne cDNA). Die sq RT-PCR wurde in 96-well Fast optical microAmp Platten der Firma Applied Biosystems angesetzt und mit entsprechend für die Fluoreszenzmessung geeigneten optisch klaren Folien verschlossen.

Die Reaktionsansätze wurden entsprechend der Herstellerangaben nach folgenden Schemata zusammengesetzt:

(a) miRNA Expression in humanen und murinen Gehirngeweben:

Reagenz	Volumen/rxn
2x TaqMan Gene Expression Mastermix	10µl
20x TaqMan Assay	1µl
Nuklease freies H ₂ O	8µl
cDNA (High Capacity cDNA reverse transcription Kit)	1µl

(b) mRNA Expression zur Genotypisierung 3xTg Mäuse

Reagenz	Volumen/rxn
2x TaqMan Universal Mastermix NoAmpErase UNG	10µl
20x TaqMan miRNA Assay	1µl
Nuklease freies H ₂ O	7,67µl
cDNA (TaqMan MicroRNA Reverse Transkription Kit)	1,33µl

Die sqRT-PCR wurde im Applied Biosystems 7500 Fast bzw. alternativ StepOne Plus (beide Applied Biosystems) Cycler mit dem nachfolgend aufgeführten vom Hersteller empfohlenen Programm durchgeführt:

Programm Real Time Cycler:	2min	50°C	40x
	10min	95°C	
	15sek	95°C	
	1min	60°C	

Die jeweils gemessenen Ct-Werte wurden von den zugehörigen Software Programmen (SDS v1.3.1 bzw. v2.2.2) ausgegeben und zur weiteren Analyse mit Excel aufbereitet.

3.1.8. Genexpressionsanalyse auf Basis von Mikroarrays**3.1.8.1. miRNA Expressionsanalyse mittels Febit Biochip**

Die genomweite miRNA Expressionanalyse für die temporalen und präfrontalen Kortizes der MUC Kohorte wurden auf Biochips (h_16v plus) der Firma Febit biomed GmbH Heidelberg hybridisiert. Auf dem Biochip sind komplementäre Sequenzen zu allen in der Datenbank miRBase Version 16 (www.mirbase.org; (Griffiths-Jones et al., 2006)) annotierten reifen humanen miRNAs, weitere durch Sequenzierung ermittelte miRNA Sequenzen sowie synthetisch hergestellte Sequenzen zur internen Kontrolle enthalten. Jede der >1200 Sequenzen wird durch 11 zufällig auf dem Biochip verteilten Replikate repräsentiert. Auf einem Biochip können 8 Proben gleichzeitig analysiert werden. Die Durchführung erfolgt entsprechend der Herstellerangaben.

Dabei wurden 500ng Gesamt-RNA zunächst fluoreszenzmarkiert und anschließend für 16 Stunden bei 42°C auf den Biochips hybridisiert. Alle weiteren Prozesse wie Waschen, Elongation der Überhänge der komplementär an die Sonden gebundenen miRNAs (Biotin-dATP-Primer) inklusive weiterer Signalverstärkung mit Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat auf der Basis der MPEA-Technologie (Microfluid Based Primer Extension Assay) erfolgen automatisiert direkt im Geniom Real Time Analyzer. Das Prinzip der MPEA-Technologie (Vorwerk et al., 2008) ist in nachfolgender Abbildung (Abb. 13) schematisch dargestellt:

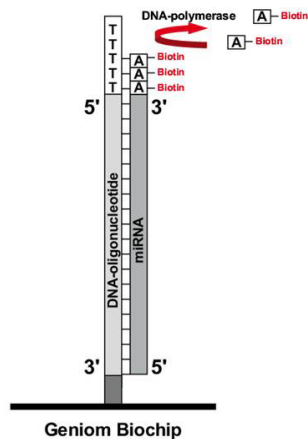


Abb. 13: Graphische Darstellung der MPEA-Technologie des febit miRNA Arrays

Quelle: (Beier & Hoheisel, 2008)

Die Signale wurden über eine CCD-Kamera detektiert und die so entstandenen Bilder über die Geniom Wizard Software analysiert. Zunächst wurden die Signalintensitäten um störende Hintergrundsignale bereinigt, dann die Signalintensitäten der Replikate jeder einzelnen miRNA-Sequenz gemittelt. Zur Korrektur der Variabilität zwischen den einzelnen gemessenen Biochips wurde eine Quantile-Normalisierung durchgeführt. Anschließend wurden die Mediane der Signalintensitäten für die einzelnen miRNA-Sequenzen für AD und Kontrolle separat berechnet. Die Sequenzen die hier in beiden Gruppen einen Median < 50 erreichten wurden als nicht exprimiert angesehen und von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Die logarithmierten (\log_2) Mediane der verbleibenden 613 miRNAs wurden unter Verwendung eines zweiseitigen t-Tests auf signifikante Expressionsunterschiede zwischen den Diagnosen untersucht. Als genomweit signifikant gelten nur p-Werte, die einer Bonferroni Korrektur für multiples Testen standhalten (p-Wert $< 8,16 \times 10^{-5}$).

3.1.8.2. mRNA Expressionsanalyse mittels Illumina HT12_v4 Beadchip

3.1.8.2.1. Herstellung biotinylierter cRNA

500ng Gesamt-RNA aus temporalen Kortizes der MUC Kohorte wurden mittels Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (AMIL 1791) amplifiziert und biotinyliert um auf Illumina Sentrix Bead arrays hybridisiert werden zu können. Die Durchführung des Protokolls erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Eine Übersicht des Prozesses ist Abb. 13 zu entnehmen.

Unter Verwendung von T7 Oligo(dT) Primern wurde die mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben und über Säulen aufgereinigt. Es folgte die *in vitro* Transkription mittels einer T7 RNA Polymerase in cRNA, während der die entstehende cRNA gleichzeitig durch Zugabe von Biotin-16-UTP biotinyliert wurde. Die Sequenz der mit Biotin markierten cRNA ist nun komplementär zur eingesetzten mRNA, weswegen sie häufig auch als antisense RNA (aRNA) bezeichnet wird.

Nach Aufreinigung der cRNA über Säulen wurde die cRNA in 50 μ l RNase freiem Wasser eluiert.

Die Konzentration wurde Platte im Spektralphotometer Infinite 200 NanoQuant analog der Beschreibung unter 3.1.3.1 des Methodenteils gemessen. Proben deren Konzentration unter 150 ng/μl lagen wurden unter Verwendung von Ammoniumacetat präzipitiert. Dazu wurde die cRNA wurde mit 1/10 Volumen 5M Natriumacetat Lösung und dem zweieinhalbfachen Volumen 100%-igen absoluten Ethanol gemischt. Nach einer Inkubation bei -20°C über Nacht wurde mit maximaler Geschwindigkeit für 15 min pelletiert. Das Pellet wurde mit 500 μl eiskaltem 70%-igem Ethanol gewaschen, 15 min mit maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und der Überstand möglichst vollständig abgenommen. Das Pellet wurde nach dem Trocknen bei Raumtemperatur in 10 μl RNase freiem Wasser resuspendiert und erneut die Konzentration gemessen.

3.1.8.2.2. Illumina Sentrix Bead Array HT12v4

Der Mikroarray besteht aus einer Vielzahl von 3μm kleinen Silica-Kügelchen die in zufälliger Anordnung über die Vertiefungen eines Silica-Trägers verteilt sind (Abb. 13). Diese so genannten Beads tragen jeweils mehrere tausend Kopien eines Oligonukleotids (Marker), dabei ist jedes Oligonukleotid-gekoppelte Bead durchschnittlich 30x auf dem Array vertreten. Insgesamt deckt der in der vorliegenden Arbeit verwendete HT12v4 Illumina Sentrix Bead Array pro Probe mehr als 47000 kodierende und nicht-kodierende Transkripte ab (NCBI RefSeq 38; Abb. 14). Auf diese Weise ermöglicht jeder BeadChip eine genomweite Expressionsanalyse für 12 Proben gleichzeitig.

Von jeder Probe wurden 750ng der cRNA zur direkten Hybridisierung auf die BeadArrays geladen. Nach mehreren Waschschritten wurde die biotinylierte cRNA mit Streptavidin-Cy3 markiert. Die durch Cy3 erzeugten Fluoreszenzsignale der fertig prozessierten BeadChips wurden über eine Kamera im Bead Array Reader (HiScan) detektiert und die erhaltenen Bilder von der iScan Control Software in entsprechende Signalintensitäten umgewandelt.

Unter Verwendung der Bead Studio Software für Genexpressionsanalysen wurden die Daten zunächst auf ihre Qualität überprüft, um den Hintergrund korrigiert und Quantile normalisiert. Marker mit einem Detection p-Value < 0,05 gelten als nicht exprimiert und werden daher aus der nachfolgenden Analyse ausgeschlossen. Marker mit einer Call rate <90 % in AD und Kontrollen sind nicht informativ und werden daher ebenfalls nicht für weitere Analysen genutzt.

Die Signalintensitäten der verbleiben Marker wurden logarithmiert (\log_2) und differentiell exprimierte Marker durch Anwenden eines zweiseitigen t-Tests ermittelt. Marker mit einem p-Wert < 0.05 gelten als nominal signifikant. Marker deren p-Wert kleiner $4,4 \times 10^{-6}$ sind genomweit signifikant, da sie auch nach eine stringenter Korrektur für multiples Testen (Bonferroni) für 11264 Marker noch signifikant wären.

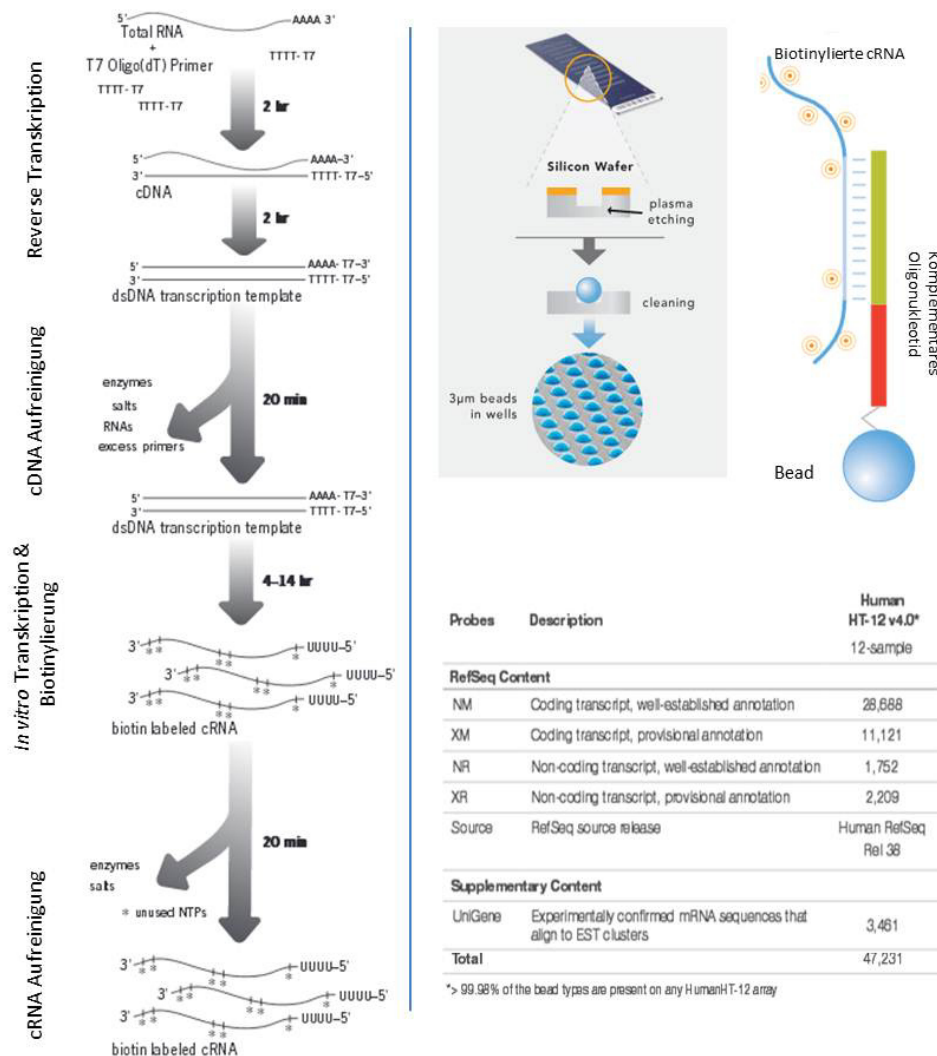


Abb. 14: Schematische Darstellung der mRNA Expressionsanalyse mittels HT12_v4 Mikroarray

Amplifikation und Biotinylierung von Gesamt-RNA mittels Illumina TotalPrep RNA Amplification Kits er cRNA (Links); Illustration des BeadChip-Prinzips (rechts oben); tabellarische Übersicht der auf dem Chip vorhandenen Marker (rechts unten)

Quellen: www.tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/IL1791ME.pdf und www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_gene_exp_analysis.pdf

3.2. Tierexperimentelle Arbeiten

3.2.1. Haltung und Züchtung von Mauslinien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäuse (3xTg; C57BL/6J) wurden unter Standardbedingungen und geregelten, pathogen-freien Konditionen in der zentralen Tierhaltungseinrichtung von Prof. Menger (Tierexperimentelle Chirurgie, Uniklinik Homburg; 3xTg), bzw. in der Tierhaltungseinrichtung von Prof. Walter (Arbeitsgruppe Epigenetik, Universität Saarbrücken; C57BL/6J) gehalten und gezüchtet. Die Verpaarungen erfolgten innerhalb der Kolonie. Die zugehörigen Experimente wurden entsprechend der Regularien des geltenden Tierschutzgesetzes genehmigt und durchgeführt.

3.2.1.1. Gewebepräparation

Die Mäuse wurden zum Zweck der Gewebeentnahme im Anschluss an eine tiefe Inhalationsnarkose umgehend dekapiert. Die Präparation des Hippocampus erfolgte dabei entsprechend der bebilderten Anleitung des Mouse Brain Gross Anatomy Atlas (www.mbl.org/anatomy_images/fresh/mbafr_1.html). Nach dem Abtragen der Schädelkalotte wurden zunächst zwei kleine nebeneinanderliegende Einschnitte am hinteren Ende beider Hemisphären gesetzt, so dass sich der zerebrale Kortex an diesen Stellen entfernen und der Hippocampus entnehmen lies. Neben dem Hippocampus wurden auch Cerebellum, Bulbus olfactorius, Medulla Oblongata und kortikales Gewebe voneinander separiert. Diese Gewebe sollten auf Deregelung der in humanen Geweben detektierten differentiell exprimierten miRNAs untersucht werden. Zusätzlich wurden das verbleibende nicht separierte Gehirngewebe, einige andere Organe (z.B. Herz, Lunge, Leber, Niere) und die Schwanzspitze entnommen. Aus dem Gewebe der Schwanzspitze wurde genomische DNA extrahiert und anschließend diese zur Genotypisierung genutzt. Die gesamte Gewebepräparation wurde auf Eis durchgeführt und die entnommenen Gewebeproben im Anschluss sofort bei -80°C weggefroren, um eine Degradation von RNAs so gering als möglich zu halten.

3.3. Zellen und Bakterien

3.3.1. Kultivierung und Passagieren von Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen (HEK293T und SH-SY5Y) wurden unter Standardbedingungen im Brutschrank bei einer Atmosphäre mit 5% CO₂, 37°C Temperatur und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

SH-SY5Y Zellen werden in DMEM mit 10 % FCS kultiviert, HEK293T Zellen in einer 1:1 Mischung DMEM und F12 mit 10% FCS. Alle 3-4 Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei ausreichender Zelldichte wurden die Zellen in neue Zellkulturgefäße passagiert. Hierzu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen und anschließend mit 0,05% Trypsin/EDTA (Gibco) inkubiert. Trypsin ist eine Endopeptidase die durch proteolytische Spaltung die Bindung der Zellen über Proteine der Zellmembran an den Boden des Zellkulturgefäßes zerstört. Die auf diese Weise abgelösten Zellen wurden zur Subkultivierung in frischem Stammkulturmedium dispergiert, um die Zellen zu vereinzeln und ein Wachstum als Monolayer-Kultur zu gewährleisten. Die Zellen verdünnt in neue Zellkulturgefäße ausgesät, wo bei die Verdünnung muss so gewählt werden muss, dass ausreichend viele Zellkontakte vorhanden sind, welche für das Erreichen Wachstumsphase essentiell sind.

3.3.2. Zell-Ernte und Kryokonservierung

Nach Ablösen der Zellen durch Trypsin/EDTA wurde die Zellsuspension 3-4 Minuten bei 1400rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde einmal in PBS gewaschen und dann entweder bis zur RNA-Präparation bei -20°C gelagert oder aber kryokonserviert. Für die Kryokonservierung wurde das Zellpellet in 1 ml DMSO-haltigem Recovery Cell Culture Freezing Medium (Gibco) gelöst und die Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde anschließend unter Verwendung einer Einfrierhilfe (Mr. Frosty) sukzessive um 1°C/min bis auf -80°C runtergekühlt. Nach zwei Tagen konnten die



Zellen dann in Flüssig-Stickstoff umgelagert. Das im Einfriermedium enthaltene DMSO verhindert die Kristallbildung während des Einfrierens, das FCS sorgt für das osmotische Gleichgewicht. Auf diese Weise lassen sich die Zellen über mehrere Jahre lagern und anschließend wieder in Kultur nehmen. Dazu wurde sofort nach der Entnahme aus dem Stickstofftank 1 ml Stammkulturmedium zugegeben, die Zellen darin vorsichtig resuspendiert und in einer Zellkulturflasche (75cm²) mit entsprechendem Stammkulturmedium ausgesät. Das zügige Erwärmen und Überführen in Stammkulturmedium ist wichtig, da DMSO in hohen Konzentrationen cytotoxisch für die Zellen ist. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Flow Werkbank durchgeführt.

3.3.3. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl trypsinierter Zellen an die Kante zwischen Deckglas und Neubauer Zählkammer aufgebracht. Durch Kapillarkraft wird diese dann in den Zwischenraum mit definiertem Volumen eingesogen. Unter einem Lichtmikroskop werden insgesamt vier Felder mit je 16 Kleinquadraten ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter lässt sich dann mit folgender Formel berechnen:

$$(\text{Anzahl gezählter Zellen}/4) * 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

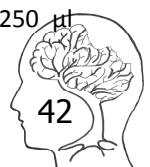
3.3.4. „Killing curve“ für Puromycin

In der vorliegenden Arbeit sollen HEK293T und SH-SY5Y Zellen einer stabilen Transfektion unterzogen werden. Die zu transfizierenden Plasmide kodieren einen für die Selektion nicht-transfizierter Zellen benötigtes Resistenzgen für Puromycin. Um bei der Kultivierung durch die Zugabe des Antibiotikums nicht auch transfizierte Zellen aufgrund einer zu hohen Dosis abzutöten, sollte die passende Konzentration in einem Vorexperiment ermittelt werden. Die Bestimmung der Konzentration des zur stabilen Transfektion benötigten Antibiotikums Puromycin erfolgte über die Erstellung einer so genannten Killing Curve. Dabei wurden zu 60-80% konfluente Zellen in einer 24-Loch Platte mit aufsteigender Puromycinkonzentration (0,5; 1; 1,5; 2; 3 µg/ml) behandelt. Die Konzentration bei der nach einer Woche keine vitalen Zellen mehr vorhanden sind, entspricht der Konzentration, die zur Selektion nicht transfizierter Zellen und damit zur Gewährleistung einer stabilen Transfektion notwendig ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde auf diese Weise eine Endkonzentration von 2 µg/ml für Puromycin ermittelt. Hierzu wurden 50ml Medium (DMEM+10% FCS) mit 100 µl Puromycin (Stock: 1 mg/ml) versetzt.

3.3.5. Hitzeschock-Transformation

Um eine ausreichende Menge an Plasmid für Transfektionen zu haben, werden diese durch eine Hitzeschock-Transformation in transformationskompetenten *E. coli* eingebracht und von den Bakterien vervielfältigt. Hierzu wurden 100 ng des entsprechenden Plasmids mit 50 µl OneShot TOP10 (Invitrogen) chemokompetenten *E. coli* Bakterien durch Invertieren gemischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurde das Gemisch einem Hitzeschock von 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt. Der Hitzeschock führt dazu dass die Zellmembran der *E. coli* Bakterien kurzzeitig porös wird und ermöglicht so die Aufnahme der Plasmid-DNA. Zur Regeneration der Bakterien wurde der Ansatz anschließend zwei Minuten auf Eis abgekühlt, mit 250 µl



vorgewärmtem LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C mit 225 rpm in den Schüttelinkubator gestellt.

200 µl des Ansatzes wurden auf einer vorgewärmten LB-Amp⁺-Agarplatte (enthält 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und nach dem Antrocknen kopfüber bei 37 °C bis zum nächsten Tag inkubiert. Das Antibiotikum gewährleistet, dass nur jene Bakterien auf der Agarplatte wachsen, die während des Hitzeschocks das zu vermehrende Plasmid aufgenommen haben, da dieses das Ampicillin-Resistenzgen kodiert.

Zum Animpfen von 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (100µg/ml) wurde je ein gut separierter Klon von der Agarplatte gepickt und für vier Stunden bei 37 °C mit 200 rpm geschüttelt. 500 µl dieser Vorkultur wurden in 50 ml LB-Amp⁺-Medium überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C mit 175 rpm schüttelnd inkubiert, am nächsten Tag bei 4°C für 25 Minuten mit 2700 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei -20°C bis zur Plasmidisolierung gelagert. Die Vorkulturreste wurden 1:1 mit 50%-igem Glycerol gemischt und bei -80°C als Bakterienstock gelagert.

3.3.6. Plasmidisolation

Zur Plasmidisolation wurde das Plasmid Midi Kit von Qiagen, das auf dem Prinzip der alkalischen Lyse basiert, entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die Aufreinigung des Lysats erfolgt entlang der Schwerkraft über Anionenaustausch-Säulen. Die nach der Transformation geernteten Zellpellets wurden in 4 ml Puffer P1 resuspendiert, mit 4 ml Puffer P2 gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 ml Puffer P3 zugesetzt und die Lösung gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis erfolgte eine 30 minütige Zentrifugation bei 4°C mit 2683g (maximale Geschwindigkeit). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und für 15 min bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säulen wurden mit je 4 ml QBT Puffer äquilibriert und anschließend der Überstand auf die Säulen gegeben. Danach wurden die Säulen zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen und die DNA in 5ml vorgewärmten Puffer QF eluiert. Nach Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wurde die DNA durch vorsichtiges Invertieren, gefällt und durch anschließende Zentrifugation bei 4°C für 30 min mit maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Das Pellet wurde mit 2 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und anschließend 15 Minuten bei 4°C mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet an der Luft für etwa 10 Minuten getrocknet. Die DNA wurde in 100µl 1xTE über Nacht bei 4°C gelöst.

3.3.7. Transfektion humaner Zelllinien mit Lipofectamin2000

Die Transfektion ist eine Methode mit der sich fremdes genetisches Material wie beispielsweise Plasmide in eukaryotische Zellen einbringen lassen. Eine Möglichkeit ist die Transfektion mit einem kationischen Lipid, welches in wässrigem Milieu typischerweise Mizellen bzw. Liposomen bildet. Bringt man diesen Lipidmonolayer mit DNA zusammen in Lösung, entsteht ein Lipidkomplex, dessen äußere Hülle der Lipidmonolayer darstellt, welcher die DNA umschließt. Gibt man diesen Lipidkomplex zu Zellen, die einige Zeit in minimalem serumfreien Medium kultiviert wurden, so kommt es durch die Verschmelzung des Lipidmonolayers mit der Zellmembran zur Abgabe der verpackten DNA in die Zelle.



Im vorliegenden Versuch wurden entsprechende Plasmide der Firma GeneCopoeia (Methodenteil 2.14) unter Verwendung von Lipofectamin2000 (Invitrogen, USA) in HEK293T und SH-SY5Y entsprechend des Herstellerprotokolls transfiziert.

Die Zellen wurden zunächst auf 6-Loch Platten bis zu einer Konfluenz von 70-90 % kultiviert. Das Stammkulturmedium wurde abgenommen, die Zellen mit 1 ml serumfreien minimal essential Medium (OptiMEM I, Invitrogen) gewaschen und anschließend mit 800 µl OptiMEM I (serumfrei) versetzt.

Zum einen wurden 10µl Lipofectamin2000 mit 100µl OptiMEM I gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum anderen wurden in der Zwischenzeit ~1,5µg Plasmid mit 100 µl OptiMEM I gemischt. Beide Lösungen wurden dann vereinigt und zur Bildung des DNA-Lipofectamin2000-Komplexes für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Lösung mit den DNA-Lipofectamin-Komplexen wurde nun vorsichtig auf die mit OptiMEM I vorbereiteten Zellen getropft. Nach vier bis sechs Stunden wurde das Medium wieder auf durch Stammkulturmedium ersetzt. Nach weiteren 24 bis 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel zu Puromycin-haltigem Stammkulturmedium (2µg/ml). Transfizierte Zellen tragen durch das aufgenommene Plasmid ein Resistenzgen und sollten dem Selektionsdruck Stand halten wohingegen Zellen die das Plasmid nicht aufgenommen, haben absterben.

Wurde das Plasmid in das Genom der transfizierten Zelle integriert, spricht man von einer stabilen Transfektion. In diesem Fall bleibt die Resistenz gegen Puromycin erhalten. Bei einer transienten Transfektion ist die Antibiotikaresistenz nur von kurzer Dauer da keine Integration ins Genom stattgefunden hat. Um zu gewährleisten, dass tatsächlich nur transient transfizierte Zellen überleben, wurde der Selektionsdruck über einige Wochen aufrechterhalten.

3.3.8. Fluoreszenzmikroskopie transfizierter Zellen

Die Fluoreszenzmikroskopie bietet eine gute Möglichkeit beispielsweise von den Zellen exprimierte Fluorophore in fixierten Zellen zu lokalisieren. Die Fluorophore absorbieren bei Anregung durch sichtbares Licht entsprechender Wellenlänge Energie, mittels derer Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Beim Zurückfallen der Elektronen auf ihren energetischen Grundzustand wird Licht emittiert, dessen Wellenlänge größer als die Anregungswellenlänge ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie der Erfolg einer Transfektion überprüft. Die transfizierten Plasmide enthalten eine Sequenz für ein rot (mCherry) bzw. grün fluoreszierendes Protein (GFP). Die mit Plasmiden transfizierten HEK293T bzw. SH-SY5Y Zellen wurden in 6-Loch Platten ausgesät, deren einzelne Vertiefungen je 3 runde Deckgläschen enthielten. Sobald eine ausreichende Zelldichte erreicht war, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 8 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1xPBS, wurde je ein Tropfen DAPI-haltiges Eindeckmedium (ProLong Gold Antifade Reagent mit 4,6-Diamidinon-2-phenylindol) auf die Zellen gegeben und das Deckgläschen über Kopf auf einen Objektträger gelegt. Um die Deckgläschen sicher auf dem Objektträger zu fixieren, wurde dieses mit klarem Nagellack umrandet.



Das im Eindeckmedium enthaltene DAPI durchdringt die Kernmembran und interkaliert in den DNA-Doppelstrang. Dieser Komplex lässt den Zellkern bei entsprechender Anregungswellenlänge im Fluoreszenzmikroskop blau erscheinen. In nachfolgender Tabelle (

Tab. 5) sind die für das Experiment relevanten Exzitations- und Emissionsmaxima zusammengefasst.

Tab. 5: Übersicht der Exzitations- und Emissionswellenlängen der zu analysierenden Fluorophoren

	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge	Farbeindruck
DAPI	358	461	blau
GFP	395	509	grün
mCherry	587	610	rot

Zur Erstellung der Fluoreszenzbilder wurde ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Leica (DM5000B) mit entsprechenden Filtern und zugehöriger Software in der Arbeitsgruppe von Prof. Schneider genutzt.

3.4. Bioinformatische Methoden zur in silico Analyse von miRNA-mRNA-Interaktionen

Zur statistischen Analyse einer möglichen Korrelation zwischen differentiell exprimierten miRNAs (hsa-miR-132-3p und hsa-miR-212-3p) und mRNAs (10 Marker) wurden lineare Regression auf den logarithmierten Signalintensitäten durchgeführt. Für p-Werte kleiner 0,05 spricht man von nominaler Signifikanz. Genomweite Signifikanz liegt vor, wenn der ermittelte p-Wert kleiner als der für multiples Testen (Bonferroni Korrektur) korrigierte p-Wert, also kleiner 5×10^{-3} ist. Insbesondere genomweit signifikante p-Werte sind ein Hinweis auf eine Assoziation zwischen den potentiellen Interaktionspartnern (Zielgenen ~ miRNA).

Zum Abgleich von validierten und vorhergesagten Bindestellen für die differentiell exprimierten miRNAs im 3' UTR der interessanten Zielgene wurde die Datenbank miRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>) genutzt.

Des Weiteren wurden die so vorhergesagten Interaktionspartner mittels des online verfügbaren Alignment Programms RNAHybrid (<https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) analysiert. Hierbei handelt es sich um ein online verfügbares Alignment Programm bei dem aus den vorhergesagten komplementären Sequenzen von miRNA und mRNA eine gemeinsame Struktur visualisiert und deren minimal freie Energie berechnet wird.

Je kleiner die Energie desto wahrscheinlicher ist hierbei die tatsächliche Entstehung dieser Struktur.



4. ERGEBNISSE

Neben den derzeit bekannten Risikofaktoren Alter und Geschlecht (Mielke, Vemuri, & Rocca, 2014), ApoE-Genotyp (Corder et al., 1993, 1994; Strittmatter et al., 1993), Risikoloci und „rare variants“ in verschiedenen anderen Suszeptibilitätsgenen (Cuyvers & Sleegers, 2016) müssen weitere nicht die genomische Sequenz betreffende Faktoren an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sein, da beispielsweise die Konkordanzraten in Zwillingsstudien kleiner 100% sind (Pedersen, Gatz, Berg, & Johansson, 2004). Seit einigen Jahren rücken daher zunehmend auch epigenetische Veränderungen im Bereich der Neurodegeneration in den Fokus der Forschung. Speziell kleine, nicht kodierende RNAs mit vielfältigen genregulatorischen Funktionen erlangen fortwährend steigendes wissenschaftliches Interesse (Fischer, 2014). Die größte Gruppe dieser Ribonukleinsäuren bilden die microRNAs. Inzwischen gibt es eine größere Zahl publizierter miRNA Studien, die sich allerdings zumeist unter Verwendung unterschiedlicher Methoden auf die Analyse einiger ausgewählter miRNAs beschränken und oftmals auf einer geringen Anzahl an Gewebeproben aus verschiedenen Gehirnregionen basieren, so dass die einzelnen Ergebnisse nur selten Gemeinsamkeiten aufweisen (Lau, Frigerio, & De Strooper, 2014). Ähnliches gilt auch für die wenigen bereits veröffentlichten Studien bezüglich der Genexpression in Morbus Alzheimer (Chandrasekaran & Bonchev, 2016; Colangelo et al., 2002; Nunez-Iglesias, Liu, Morgan, Finch, & Zhou, 2010; Puthiyedth, Riveros, Berretta, & Moscato, 2016).

Daher soll in der vorliegenden Arbeit zum einen eine genomweite Expressionsanalyse von microRNAs in kortikalem Gehirngewebe von mehr als 300 Alzheimer- und Kontroll-Proben durchgeführt werden, zum anderen sollen parallel auch Expressionsveränderungen auf mRNA Ebene untersucht werden. Anschließend sollen beide Datensätze genutzt werden, um *in silico* nach potentiell interessanten miRNA-mRNA-Interaktionen zu suchen.

Nachfolgende Abbildung (Abb. 15) bietet eine Übersicht über die durchgeführten Experimente und Analysen deren einzelne Ergebnisse im Anschluss näher beschrieben werden.

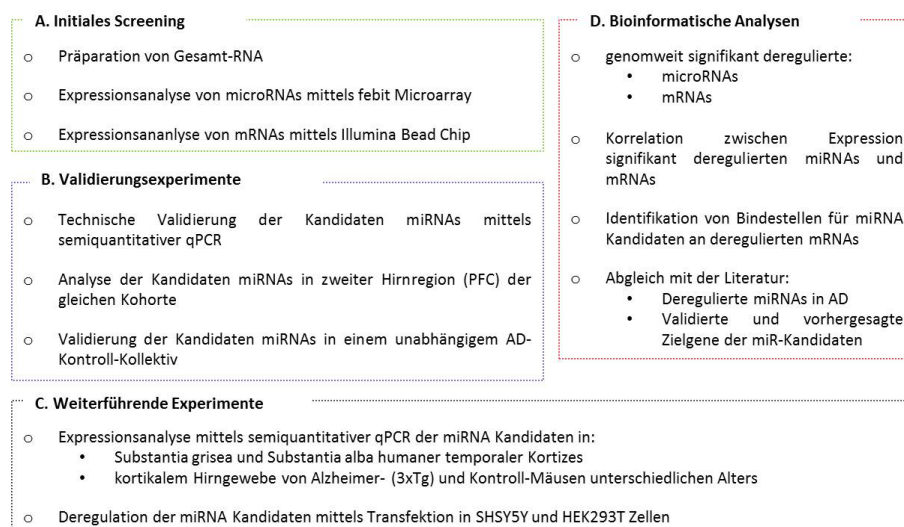


Abb. 15: Experimentübersicht

Übersicht zu den in der Arbeit durchgeführten Experimenten ausgehend von initialen Screenings über Validierungsexperimenten bis hin zu weiterführenden Experimenten, sowie deren bioinformatisch gestützten Analysen.

4.1. Analysen zur Expression von microRNAs in Morbus Alzheimer

4.1.1. Genomweites microRNA Expressionsprofil im temporalen Kortex

Zunächst wurde unter Verwendung von miRNeasy Mini Kits (Qiagen) Gesamt-RNA (> 18nt) aus den temporalen Kortexen von 39 Alzheimer Patienten und 25 gesunden Kontrollen präpariert. Die epidemiologischen Daten, die von der Deutschen Gehirnbank München erworbenen Proben (MUC Kohorte), sind in zwei Tabellen unter Material und Methoden übersichtlich zusammengestellt (Material Tab. 1 und Tab. 2).

Die Gesamt-RNAs wurden auf Biochips der Firma Febit hybridisiert und die Signalintensitäten für in miRBase Version16 annotierte humane miRNAs auf der Geniom Realtime Analyzer Plattform für Mikroarrays gemessen. Unter den analysierten Proben befanden sich vier Proben, die je zweimal als biologisch-technische Replikate, zur internen Kontrolle präpariert und gemessen wurden. Die Signalintensitäten der Replikate korrelieren zu mehr als 90 % mit dem zugehörigen Duplikat (Tab. 6). Eine Ausnahme ist Replikat 2A, welches im Gegensatz zu den anderen Replikaten eine sehr geringe Korrelation zu jedem anderen Replikat und den restlichen Proben aufwies. Aus diesem Grunde wurde Rep2A aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Tab. 6: Korrelation der Expressionsdaten zwischen biologisch-technischen Replikaten

Tabellarische Übersicht der Korrelation zwischen den biologisch-technischen Replikaten der miRNA Expressionsanalyse. Die Daten zu Rep2A (grau unterlegt) wurden aufgrund der schlechten Korrelationen aus der weiteren Analyse ausgeschlossen.

	Rep1A	Rep1B	Rep2A	Rep2B	Rep3A	Rep3B	Rep4A	Rep4B
Rep1A	1,000	0,911	0,423	0,902	0,722	0,686	0,726	0,672
Rep1B	0,911	1,000	0,422	0,965	0,805	0,831	0,806	0,812
Rep2A	0,423	0,422	1,000	0,404	0,361	0,401	0,359	0,392
Rep2B	0,902	0,965	0,404	1,000	0,864	0,836	0,883	0,842
Rep3A	0,722	0,805	0,361	0,864	1,000	0,911	0,967	0,892
Rep3B	0,686	0,831	0,401	0,836	0,911	1,000	0,909	0,978
Rep4A	0,726	0,806	0,359	0,883	0,967	0,909	1,000	0,922
Rep4B	0,672	0,812	0,392	0,842	0,892	0,978	0,922	1,000

Aus den Daten wurden alle nicht exprimierten und nicht informativen miRNAs herausgefiltert, so dass für die statistische Analyse schließlich Signalintensitäten von 613 reifen miRNAs zur Verfügung standen. Die Daten wurden logarithmiert (\log_2) um eine Normalverteilung zu gewährleisten. Die Verteilung der logarithmierten Signalintensitäten ist in nachfolgender Abbildung (Abb. 16) gemeinsam für AD und Kontrollproben graphisch dargestellt.

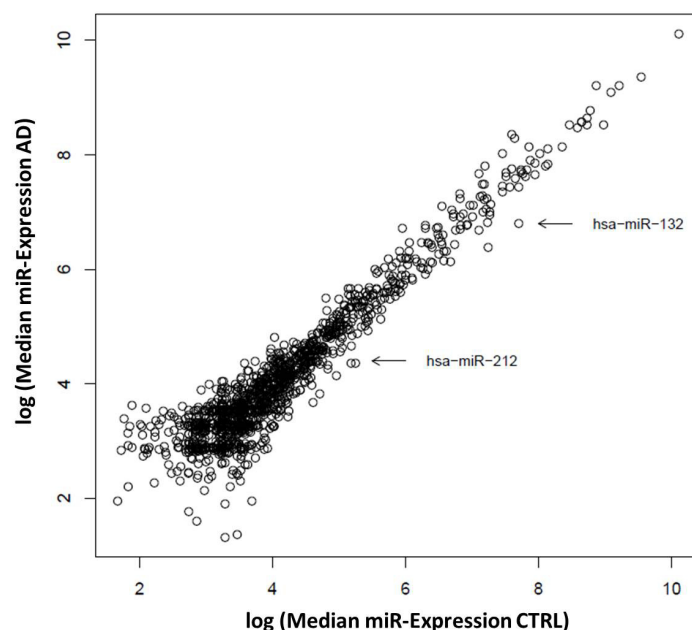


Abb. 16: Verteilung der genomweiten miRNA Expression

Die in 39 AD und 25 gesunden Kontrollen der MUC Kohorte auf Geniom Biochips der Firma Febit gemessenen Signalintensitäten für 613 miRNAs wurden um den Hintergrund korrigiert und einer Quantil-Normalisierung unterzogen. Die Mediane der logarithmierten Signalintensitäten (\log_2) der einzelnen miRNAs für AD und CTRL wurden anschließend graphisch aufgetragen. Die beiden genomweit signifikant herunterregulierten miRNAs sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Alter und Geschlecht wurden zunächst als potentielle Kovariaten in eine logistische Regression eingebunden, zeigten jedoch keinen signifikanten Einfluss. Zwar korrelieren die Diagnose und Braak Stadium sowie Diagnose und Vorhandensein eines Apo ϵ 4 Allels, dennoch eignen sich beide aufgrund der Redundanz mit der Diagnose nicht als Kovariaten (Tab. 7). Daher wurde zur statistischen Analyse der Daten ein zweiseitiger t-Test herangezogen.

Tab. 7: Korrelation potentiell interessanter Kovariaten für die statistische Analyse der Expressionsdaten

Tabellarische Übersicht der Korrelation potentiell interessanter Kovariaten. Die stärksten Korrelation (Braak Stadium vs. Diagnose; Diagnose vs. Apo ϵ 4 Allel) sind grau hinterlegt

	Geschlecht	Alter	Diagnose	Braak Stadium	Apo ϵ 4+
Geschlecht	1,000	0,343	0,226	0,266	0,113
Alter	0,343	1,000	0,474	0,387	0,352
Diagnose	0,226	0,474	1,000	0,852	0,480
Braak Stadium	0,266	0,387	0,852	1,000	0,459
Apoϵ4+	0,113	0,352	0,480	0,459	1,000

Insgesamt zeigten 102 miRNAs eine signifikante Deregulation (p -Wert $< 0,05$; Tab. 8), wobei 41 der identifizierten miRNAs ein höheres und 61 miRNAs ein niedrigeres Expressionslevel in den untersuchten Alzheimer Patienten im Vergleich zu den kognitiv gesunden Kontrollen zeigten. Lau *et al.* 2013 (Lau et al., 2013) und Satoh *et al.* 2012 (Satoh, 2012) haben insgesamt 323 bereits mit AD assoziierte miRNAs aus verschiedenen Publikationen zusammengetragen. Beim Abgleich dieser Liste - ungeachtet der analysierten Gehirnregion - mit den hier identifizierten 102 deregulierten miRNAs ergibt sich eine Schnittmenge von insgesamt 27 miRNAs. Für 14 dieser miRNAs stimmt der beobachtete Trend der Expression mit dem der Literatur überein. Die p -Werte

aller miRNAs, die zugehörigen Signalintensitäten, sowie der beobachtete und der recherchierte Trend in AD aus der Literaturrecherche, sind in untenstehender Tabelle übersichtlich zusammengestellt (Tab. 8).

Tab. 8: Im temporalen Kortex von AD Patienten deregulierte miRNAs

Die Tabelle gibt die logarithmierten (\log_2) Mediane der Signalintensitäten, sowie die nominalen p-Werte der 102 deregulierten miRNAs wider, die während des miRNA Screenings in 64 humanen temporalen Kortexen identifiziert wurden. Zusätzlich wurden Trends aus der Literatur angegeben, sofern die deregulierten miRNAs schon mit Alzheimer assoziiert wurden. Mit ^(*) gekennzeichnete p-Werte erreichten genomweite Signifikanz nach Bonferroni Korrektur für multiples Testen ($p\text{-Wert} < 8,16 \times 10^{-5}$). Fettgedruckte Pfeile weisen auf eine nicht übereinstimmende Regulation hin.

miRNA	log ₂ Median der Signalintensität		Trend in AD	p-Wert t-Test	Trend in AD laut Literatur
	Ctrl	AD			
hsa-miR-132	11,12	9,82	↓	5,02x10 ⁻⁰⁷ (*)	↓ (Cogswell et al., 2008; Lau et al., 2013)
hsa-miR-212	7,57	6,28	↓	2,38x10 ⁻⁰⁶ (*)	↓ (Cogswell et al., 2008; Wang, Huang, Hu, Stromberg, & Nelson, 2011)
hsa-miR-423-3p	7,78	7,23	↓	1,69x10 ⁻⁰⁴	↑ (Cogswell et al., 2008); ↓ (Wang et al., 2011)
hsa-miR-10b	10,45	9,21	↓	6,39x10 ⁻⁰⁴	↓ (Lau et al., 2013)
hsa-miR-592	6,10	5,30	↓	6,81x10 ⁻⁰⁴	
hsa-miR-129-3p	12,95	12,30	↓	1,21x10 ⁻⁰³	↓ (Lau et al., 2013; Wang et al., 2011)
hsa-miR-590-5p	6,47	5,97	↓	1,63x10 ⁻⁰³	
hsa-miR-22	9,73	9,29	↓	2,23x10 ⁻⁰³	↓ (Hébert et al., 2008; Wang et al., 2011)
hsa-miR-1274b	8,59	9,70	↑	3,00x10 ⁻⁰³	
hsa-miR-323-3p	9,49	9,13	↓	3,45x10 ⁻⁰³	
hsa-miR-543	6,28	5,59	↓	3,47x10 ⁻⁰³	↓ (Lau et al., 2013)
hsa-miR-664	10,96	12,06	↑	3,77x10 ⁻⁰³	
hsa-miR-143	10,76	11,57	↑	3,86x10 ⁻⁰³	↓ (Wang et al., 2011); ↑ (Cogswell et al., 2008)
hsa-miR-195	12,79	13,29	↑	4,43x10 ⁻⁰³	↓ (Wang et al., 2011); ↑ (Lau et al., 2013)
hsa-miR-369-5p	5,78	4,69	↓	4,72x10 ⁻⁰³	
hsa-miR-3122	6,11	4,94	↓	4,86x10 ⁻⁰³	
hsa-miR-148b	8,61	8,28	↓	5,90x10 ⁻⁰³	↓ (Nunez-Iglesias et al., 2010; Wang et al., 2011); ↑ (Cogswell et al., 2008)
hsa-miR-1289	6,22	5,51	↓	6,25x10 ⁻⁰³	
hsa-miR-876-5p	10,38	11,26	↑	6,43x10 ⁻⁰³	
hsa-miR-129-5p	7,16	5,97	↓	6,51x10 ⁻⁰³	↓ (Lau et al., 2013; Wang et al., 2011)
hsa-miR-4270	9,44	10,25	↑	7,23x10 ⁻⁰³	
hsa-miR-409-5p	9,24	8,82	↓	8,61x10 ⁻⁰³	↓ (Lau et al., 2013)
hsa-miR-584	5,81	4,69	↓	8,77x10 ⁻⁰³	↓ (Wang et al., 2011)
hsa-miR-449c*	8,65	8,38	↓	9,39x10 ⁻⁰³	
hsa-miR-296-3p	6,93	7,95	↑	9,42x10 ⁻⁰³	
hsa-miR-1972	8,74	9,34	↑	1,14x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-126	11,47	11,04	↓	1,14x10 ⁻⁰²	↓ (Wang et al., 2011)
hsa-miR-490-5p	6,60	6,17	↓	1,14x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-148b*	10,00	9,79	↓	1,16x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-3943	7,61	7,04	↓	1,22x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-554	5,75	4,76	↓	1,27x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-3922	9,38	9,06	↓	1,36x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-1324	5,74	6,66	↑	1,36x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-186*	6,09	5,46	↓	1,37x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-191	9,54	9,13	↓	1,40x10 ⁻⁰²	↓ (Cogswell et al., 2008; Wang et al., 2011)
hsa-miR-138	11,26	11,01	↓	1,41x10 ⁻⁰²	↓ (Lau et al., 2013; Wang et al., 2011)
hsa-miR-3665	6,14	5,70	↓	1,50x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-7	6,80	5,53	↓	1,53x10 ⁻⁰²	↓ (Wang et al., 2011); ↑ (Cogswell et al., 2008)
hsa-miR-3074	9,49	8,87	↓	1,55x10 ⁻⁰²	
hsa-let-7i	6,52	5,98	↓	1,58x10 ⁻⁰²	↓ (Hébert et al., 2008; Wang et al., 2011); ↑ (Lau et al., 2013)
hsa-miR-200a	6,14	5,58	↓	1,61x10 ⁻⁰²	↑ (Lau et al., 2013)
hsa-miR-32	5,79	5,13	↓	1,61x10 ⁻⁰²	↓ (Wang et al., 2011)
hsa-miR-152	8,70	8,78	↑	1,61x10 ⁻⁰²	



hsa-miR-484	9,09	8,54	↓	1,64x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-3202	6,01	6,59	↑	1,65x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-596	6,87	6,67	↓	1,73x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-1246	4,67	5,84	↑	1,89x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-500a	5,81	6,94	↑	1,91x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-1200	6,46	6,16	↓	1,91x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-92a-2*	4,67	5,65	↑	2,00x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-762	9,83	10,57	↑	2,02x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-3621	8,03	8,56	↑	2,05x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-324-5p	8,81	8,39	↓	2,08x10 ⁻⁰²	↑ (Cogswell et al., 2008)
hsa-miR-519d	8,53	9,13	↑	2,16x10 ⁻⁰²	↓ (Wang et al., 2011); ↑ (Cogswell et al., 2008)
hsa-miR-486-5p	7,49	6,99	↓	2,19x10 ⁻⁰²	↑ (Nunez-Iglesias et al., 2010)
hsa-miR-3622b-3p	7,40	7,14	↓	2,22x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-1234	8,51	8,15	↓	2,24x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-517b	5,23	6,09	↑	2,29x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-4307	5,79	4,69	↓	2,33x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-3605-5p	5,87	6,40	↑	2,34x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-29b-2*	5,85	5,01	↓	2,38x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-3141	11,02	11,98	↑	2,41x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-3941	9,09	9,70	↑	2,43x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-628-3p	7,85	7,36	↓	2,47x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-3199	5,65	5,15	↓	2,48x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-376c	9,14	8,67	↓	2,49x10 ⁻⁰²	↓ (Nunez-Iglesias et al., 2010; Wang et al., 2011)
hsa-miR-183*	9,37	9,73	↑	2,53x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-523	8,12	7,40	↓	2,64x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-196b*	5,75	6,39	↑	2,72x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-30c	5,92	6,33	↑	2,72x10 ⁻⁰²	↓ (Cogswell et al., 2008; Wang et al., 2011); ↑ (Cogswell et al., 2008)
hsa-miR-3909	8,55	8,96	↑	2,83x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-144	6,27	5,94	↓	2,87x10 ⁻⁰²	↑ (Wang et al., 2011)
hsa-miR-610	8,54	8,07	↓	2,91x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-497*	6,12	5,94	↓	2,93x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-943	6,75	7,06	↑	2,93x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-548t	6,02	6,76	↑	2,94x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-4295	7,85	7,44	↓	3,06x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-3622b-5p	7,46	7,98	↑	3,07x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-550a	5,63	5,92	↑	3,08x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-3124	7,84	7,12	↓	3,11x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-518c	8,44	8,10	↓	3,11x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-1228*	10,25	11,08	↑	3,14x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-2117	5,42	5,99	↑	3,30x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-423-5p	7,99	8,65	↑	3,33x10 ⁻⁰²	↓ (Wang et al., 2011)
hsa-miR-200b*	8,54	8,31	↓	3,34x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-4276	6,46	6,16	↓	3,34x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-9*	12,06	11,74	↓	3,36x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-302c	5,39	6,34	↑	3,43x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-675	7,34	7,74	↑	3,48x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-515-5p	6,46	6,12	↓	3,51x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-301b	6,48	6,80	↑	3,64x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-191*	5,66	4,15	↓	3,93x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-514b-3p	7,57	7,81	↑	4,03x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-635	6,71	6,33	↓	4,24x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-603	6,86	6,34	↓	4,26x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-1293	5,08	5,89	↑	4,36x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-608	7,41	8,17	↑	4,46x10 ⁻⁰²	
hsa-miR-149*	9,84	10,45	↑	4,61x10 ⁻⁰²	

hsa-miR-3689a-5p	10,25	9,66	↓	$4,63 \times 10^{-02}$
hsa-miR-3911	5,42	5,94	↑	$4,70 \times 10^{-02}$
hsa-miR-3133	7,51	7,84	↑	$4,78 \times 10^{-02}$
hsa-miR-875-3p	8,20	7,94	↓	$4,99 \times 10^{-02}$

Nur zwei microRNAs - hsa-miR-132-3p (MIMAT0000426) und hsa-miR-212-3p (MIMAT0000269) - waren robust gegen eine stringente Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni ($p\text{-Wert} < 8,16 \times 10^{-05}$) und erreichten somit genomweit signifikante p -Werte ($p_{\text{hsa-miR-132-3p}} = 5,02 \times 10^{-07}$; $p_{\text{hsa-miR-212-3p}} = 2,38 \times 10^{-06}$). Wie aus vorhergehender Tabelle 4 ersichtlich, wurden beide miRNAs inzwischen von verschiedenen Arbeitsgruppen mit Alzheimer in Verbindung gebracht (Tab. 8). Im Allgemeinen waren unabhängig von der Diagnose höhere Expressionslevel für hsa-miR-132-3p als für hsa-miR-212-3p zu beobachten. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Expressionslevels der einzelnen Proben graphisch aufträgt. Beide miRNAs zeigen jedoch eine vergleichbar starke Herunterregulation auf nahezu 60% in AD verglichen mit den Kontrollen ($\text{fold}_{\text{hsa-miR-132-3p}} = 0,407$; $\text{fold}_{\text{hsa-miR-212-3p}} = 0,409$; Abb. 17 A und B). Zur Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit zwischen miRNA Expressionslevel und Erkrankungsstadium wurde eine lineare Regression der Expressionswerte gegen die Braak Stadien berechnet. Es zeigte sich, dass die Expression beider miRNAs signifikant mit Fortschreiten der Erkrankung abnimmt (Abb. 17 C und D; $p_{\text{hsa-miR-132-3p}} = 3,86 \times 10^{-08}$; $p_{\text{hsa-miR-212-3p}} = 1,13 \times 10^{-05}$).

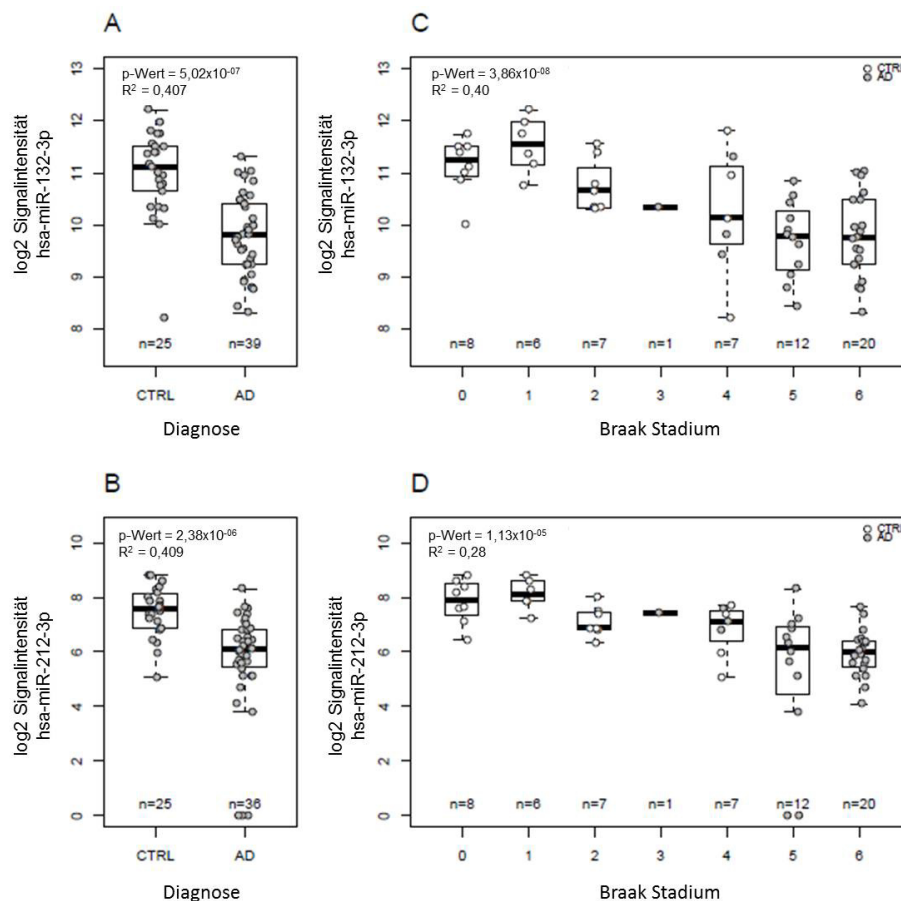


Abb. 17: Graphische Darstellung der miR-132/212 Expressionslevels gegen Diagnose und Braak Stadien in temporalen Kortizes der MUC Kohorte

Verteilung der logarithmierten Signalintensitäten für (A) hsa-miR-132-3p und (B) hsa-miR-212-3p nach Diagnose und Braak Stadien in 64 analysierten humanen temporalen Kortizes. Beide miRNAs zeigen eine ~ 60 %-ige Herunterregulation in AD im Vergleich zu den gesunden Kontrollen ($p_{\text{hsa-miR-132-3p}} = 5,02 \times 10^{-07}$; $p_{\text{hsa-miR-212-3p}} = 2,38 \times 10^{-06}$). Die Expressionslevels sind mit der Progredienz der Erkrankung assoziiert und sinken ab Braak Stadium II ($p_{\text{hsa-miR-132-3p}} = 3,86 \times 10^{-08}$, $R^2 = 0,40$; $p_{\text{hsa-miR-212-3p}} = 1,13 \times 10^{-05}$, $R^2 = 0,28$). p -Werte und R^2 wurden mittels linearer Regressionsanalyse in Rgui berechnet.

4.1.2. Validierung der genomweit signifikanten microRNAs

Die Ergebnisse des ersten Screenings weisen auf eine Vielzahl deregulierter und teilweise schon in der Literatur mit AD assoziierten miRNAs hin, wobei nur die miRNAs des miR-132/212 Clusters tatsächlich genomweite Signifikanz erreichten. Zudem konnte für diese beiden microRNAs eine verstärkte Herunterregulation mit fortschreitender Erkrankung ab Braak Stadium II beobachtet werden.

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die Expressionsmuster für miR-132 und miR-212 mittels semi-quantitativer real time PCR einerseits (i) in den temporalen und (ii) präfrontalen Kortexen von je 8 Kontroll-AD Paaren gleichen Geschlechts und ähnlichen Alters der MUC Kohorte (MUC Validierungsset) und andererseits (iii) in präfrontalen Kortexen einer unabhängigen Kohorte (225 AD, 87 Kontrollen), die von der Niederländischen Gehirnbank bezogen wurden (NBB Validierungsset), untersucht (Material 2.10 Tab. 1, Tab. 2). Die Ergebnisse wurden graphisch aufgearbeitet und sind Abb. 18 A-H zu entnehmen.

In allen Ansätzen wurde für beide miRNAs ein höherer dCt-Wert und damit ein niedrigeres Expressionslevel in den AD-Proben verglichen mit den Kontrollen beobachtet (MUC Validierungsset TC: $p_{\text{hsa-miR-132-3p}} = 2,68 \times 10^{-03}$; $p_{\text{hsa-miR-212-3p}} = 1,81 \times 10^{-02}$; PFC: $p_{\text{hsa-miR-132-3p}} = 4,80 \times 10^{-02}$; $p_{\text{hsa-miR-212-3p}} = 1,72 \times 10^{-02}$; NBB Validierungsset: $p_{\text{hsa-miR-132-3p}} = 5,43 \times 10^{-18}$; $p_{\text{hsa-miR-212-3p}} = 3,53 \times 10^{-18}$; Abb. 18 A-F). Die Expressionslevels beider miRNAs waren in AD um etwa 45-65% niedriger als in den Kontrollen (hsa-miR-132-3p: $\text{fold}_{\text{TC_MUC}} = 0,347$, $\text{fold}_{\text{PFC_MUC}} = 0,548$, $\text{fold}_{\text{PFC_NBB}} = 0,413$; hsa-miR-212-3p: $\text{fold}_{\text{TC_MUC}} = 0,476$, $\text{fold}_{\text{PFC_MUC}} = 0,513$, $\text{fold}_{\text{PFC_NBB}} = 0,391$), wobei die Expressionslevel von hsa-miR-132-3p stets über den Expressionslevels von hsa-miR-212-3p lagen. Aufgrund der übereinstimmenden Ergebnisse in den verschiedenen Gehirnregionen und Kohorten wurden alle Daten zusammengefasst und noch einmal gemeinsam analysiert. Das Resultat war eine Verminderung der Expression beider miRNAs um nahezu 65 % (hsa-miR-132-3p: $p = 4,86 \times 10^{-20}$, $\text{fold} = 0,371$; hsa-miR-212-3p: $p = 2,38 \times 10^{-20}$, $\text{fold} = 0,356$). Die Ergebnisse der semiquantitativen real time PCR verifizieren demnach die Daten der genomweiten Analyse für das miR-132/212 Cluster.

4.1.3. Analyse zum zellulären Ursprung der Deregulation des miR-132/212 Clusters

Alle bisher beschriebenen Ergebnisse basieren auf Untersuchungen in kortikalem Gehirngewebe, welches das gesamte Spektrum neuronaler und glialer Zelltypen beinhaltet. Analog zur Genexpression ist die Expression von microRNAs abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Um den zellulären Ursprung der veränderten Expression von hsa-miR-132-3p und hsa-miR-212-3p näher zu untersuchen, wurden aus präfrontalem Gewebe von acht Probenpaaren vergleichbaren Alters und identischem Geschlecht des NBB Validierungssets graue und weiße Substanz separiert und unter Verwendung spezifischer TaqMan Assay in einer semiquantitativen real time PCR analysiert. Die graue Substanz beinhaltet vorwiegend Nervenzellkörpern, wohingegen die weiße Substanz vorwiegend aus Nervenzellfasern und sie umgebende Gliazellen besteht. Eine Separation ermöglicht somit eine Anreicherung der jeweils darin überwiegenden Zelltypen. Die graphische Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abb. 18 G-J.

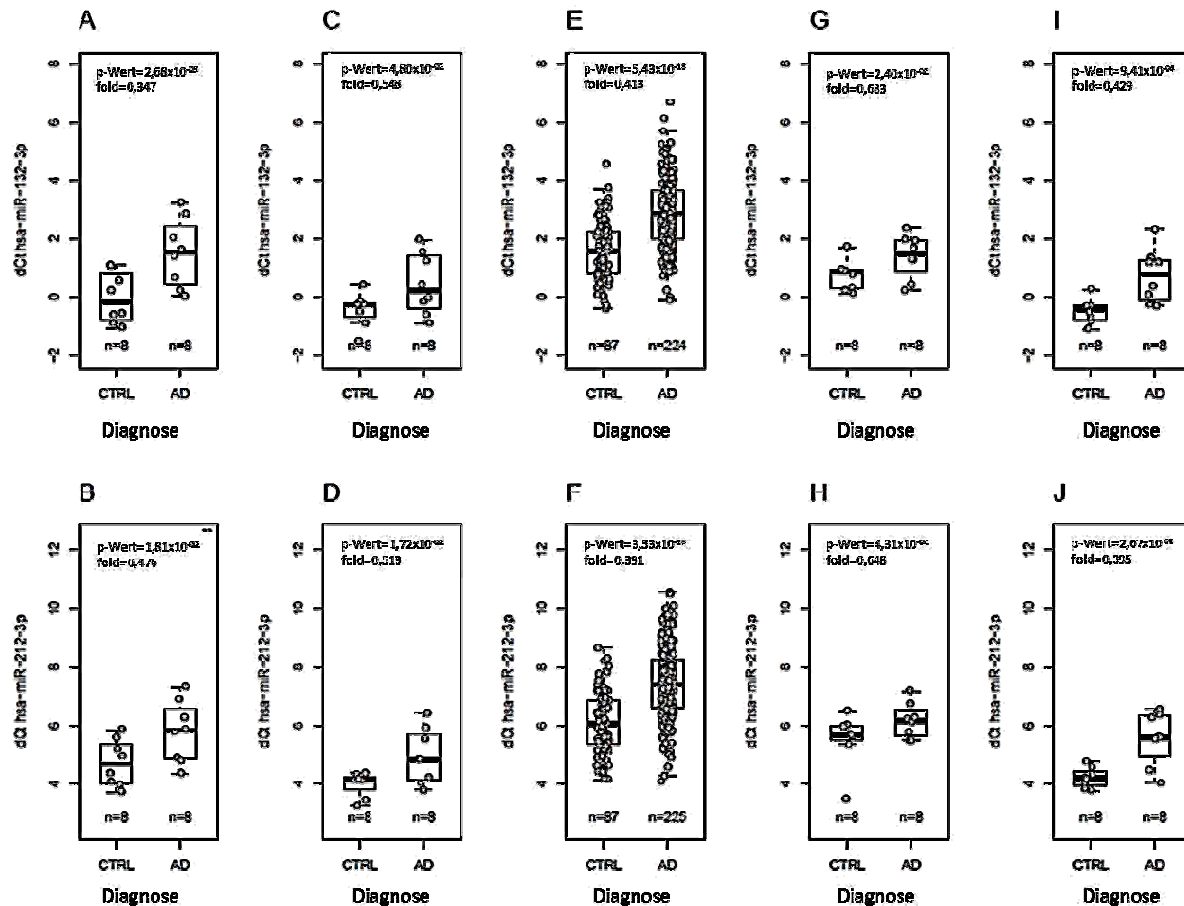


Abb. 18: Verteilung der mittels semiquantitativer real time PCR gemessenen miRNA Expressionswerte

Graphische Darstellung der dCt-Werte für miR-132 (A, C, E, G, I) und miR-212 (B, D, F, H, J) ermittelt in temporalen (A, B) und präfrontalen Kortexen (C, D) des MUC Validierungssets, in präfrontalen Kortexen der NBB Kohorte (E, F) und in weißer (G, H) und grauer Substanz (I, J) separierte PFC des NBB Validierungssets. Die dCt-Werte wurden gegen RNU48 normalisiert. Die Berechnung der p-Werte erfolgte mittels gepaartem (A-D) bzw. ungepaartem (E-J) t-Test.

Beide microRNAs zeigen, ungeachtet der Diagnose, in der weißen Substanz geringere Expressionslevel als in der grauen Substanz. In beiden Geweben sind miR-132 und miR-212 in AD signifikant schwächer exprimiert als in den gesunden Kontrollen, jedoch fällt dieser Unterschied in der weißen Substanz geringer aus (hsa-miR-132-3p: $p_{\text{weiß}} = 2,40 \times 10^{-02}$, $\text{fold}_{\text{weiß}} = 0,633$; hsa-miR-212-3p: $p_{\text{weiß}} = 4,31 \times 10^{-02}$, $\text{fold}_{\text{weiß}} = 0,648$; hsa-miR-132-3p: $p_{\text{grau}} = 9,41 \times 10^{-04}$, $\text{fold}_{\text{grau}} = 0,429$; hsa-miR-212-3p: $p_{\text{grau}} = 2,67 \times 10^{-03}$, $\text{fold}_{\text{grau}} = 0,395$).

Die Ergebnisse zeigen demnach eine stärkere Herunterregulation für miR-132/212 in der grauen Substanz, welche im Vergleich zur weißen Substanz einen deutlich höheren Anteil an Neuronen und Dendriten enthält.

4.1.4. Expression neuronaler miRNAs im Verlauf der Erkrankung

Eine der Charakteristika von Morbus Alzheimer ist die neuronale Degradation. Dieser mit der Erkrankung gleichmäßig fortschreitende Verlust von Nervenzellen könnte ein Grund für das beobachtete geringe Expressionslevel in der grauen Substanz von Alzheimer Patienten darstellen. Um dies zu überprüfen, wurden die in den temporalen Kortexen der MUC Kohorte erhobenen Expressionsdaten der genomweiten Mikroarray-Analyse für einige laut Literatur rein neuronal exprimierte miRNAs (Lau et al., 2013) sowie für die beiden microRNAs des miR-132/212 Clusters über die einzelnen Braak Stadien graphisch aufgetragen (Abb. 19).



Während die Expression für hsa-miR-132-3p und hsa-miR-212-3p ab Braak Stadium II drastisch abnimmt, scheinen die Expressionslevels der anderen neuronalen microRNAs um einen bestimmten Wert zu schwanken. Einen zum miR-132/212 Cluster ähnlichen Verlauf zeigt sich ab den Braak Stadien III-IV für hsa-miR-129-3p und hsa-miR-129-5p. Diese beiden miRNAs gehören zu den 20 am stärksten deregulierten miRNAs der vorliegenden Arbeit (Tab. 8).

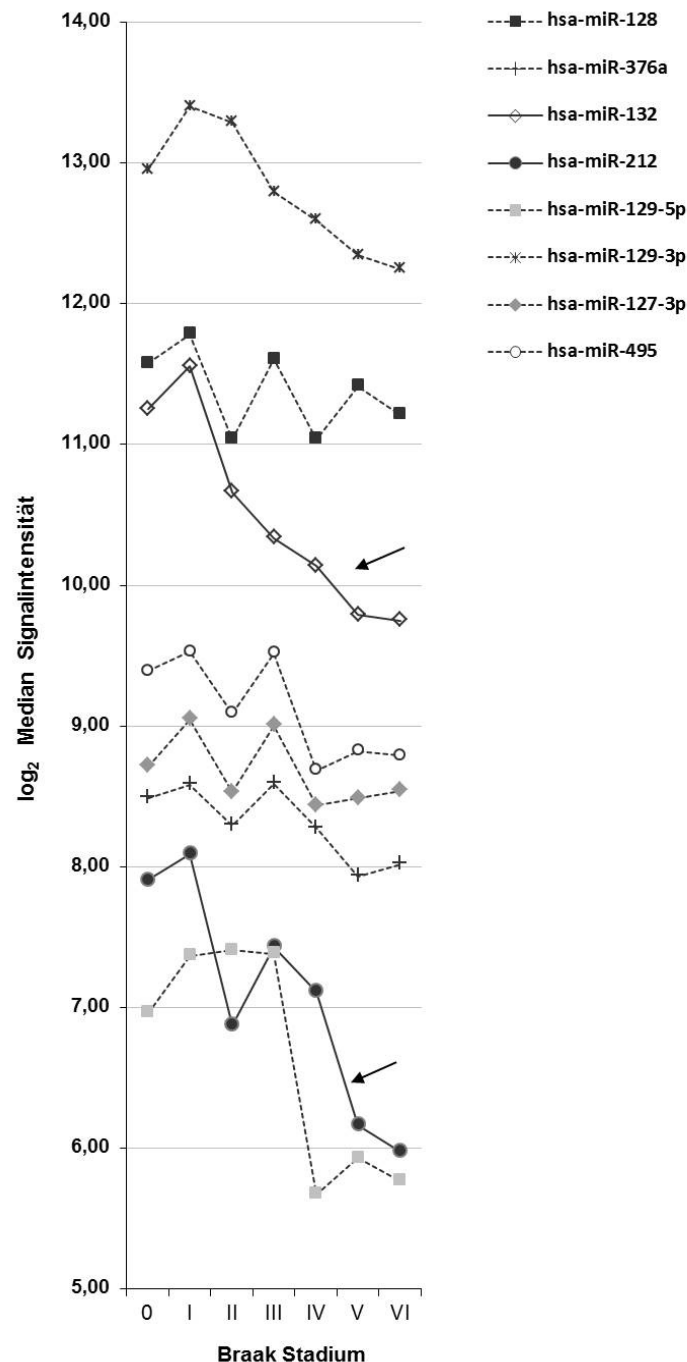


Abb. 19: Logarithmierte Signalintensitäten neuronal exprimierter miRNAs über die Braak Stadien 0-VI

Graphische Darstellung der Mediane der \log_2 Signalintensitäten über die Braak Stadien für einige ausgewählte miRNAs, die in der Literatur als primär neuronal exprimierte miRNAs beschrieben wurden (Lau et al., 2013) inklusive des miR-132/212 Clusters. Die Daten wurden in der initialen genomweiten Mikroarray-Analyse von 39 AD-Proben und 25 gesunden Kontrollen der MUC Kohorte generiert.

4.2. Analysen zur Genexpression in Morbus Alzheimer

Parallel zum genomweiten microRNA Profil sollten zusätzlich auch die genomweiten Genexpressionslevel in den 64 temporalen Kortizes der MUC Kohorte bestimmt werden. Auf dem hierzu genutzten Bead Chip der Firma Illumina (HT12_v4) lassen sich pro Probe 47231 Marker (NCBI RefSeq38) kodierender und nicht-kodierender Transkripte gleichzeitig analysieren. Die gemessenen Signalintensitäten wurden normalisiert, gefiltert und anschließend, um eine für die statistische Analyse notwendige Normalverteilung sicher zu stellen, logarithmiert. Die verbleibenden 11264 informativen Illumina Marker wurden unter Anwendung eines t-Tests auf signifikante Unterschiede zwischen AD und Kontrolle untersucht. Insgesamt konnten 3544 differentiell exprimierte Marker, welche zu 3270 unterschiedlichen Genen gehören, identifiziert werden (p -Wert $< 0,05$). Die 20 am stärksten differentiell exprimierten Gene der Analyse sind nach p -Werten sortiert in nachfolgender Tabelle (Tab. 9) aufgelistet. Die vollständige Tabelle für alle 3270 Transkripte findet sich als separate Excel-Datei in der Veröffentlichung ([Pichler et al 2016](#)).

Tab. 9: Im temporalen Kortex von AD differentiell exprimierte Transkripte

Auflistung der 20 am stärksten differentiell exprimierten Gene der genomweiten mRNA Analyse nach p -Werten sortiert. Transkripte mit p -Werte $< 4,4 \times 10^{-06}$ erreichen nach Bonferroni Korrektur für multiples Testen genomweite Signifikanz.

Gen ID	Marker ID	p-Wert t-Test	Median log ₂ AD	Median log ₂ CTRL	Trend in AD	Anzahl signifikanter Marker
RNU1G2	ILMN_3244646	$1,51 \times 10^{-09}$	9,32	8,03	↑	1
RNU1-3	ILMN_3246273	$4,37 \times 10^{-09}$	9,43	8,13	↑	1
RNU1-5	ILMN_3236653	$1,55 \times 10^{-08}$	9,80	8,49	↑	1
AEBP1	ILMN_1736178	$9,74 \times 10^{-08}$	8,63	7,41	↑	1
NFKB1	ILMN_1714965	$1,44 \times 10^{-07}$	8,77	8,31	↑	1
PKN2	ILMN_1706825	$6,34 \times 10^{-07}$	7,73	7,40	↑	1
HBP1	ILMN_2160764	$7,51 \times 10^{-07}$	7,35	7,06	↑	2
CSORF41	ILMN_2195821	$8,90 \times 10^{-07}$	8,66	8,15	↑	2
TSPAN7	ILMN_1809291	$3,32 \times 10^{-06}$	8,51	10,36	↓	2
GFAP	ILMN_1697176	$3,70 \times 10^{-06}$	13,17	12,13	↑	1
KCNF1	ILMN_1671392	$5,03 \times 10^{-06}$	8,20	8,98	↓	1
MAP1LC3A	ILMN_1776188	$5,18 \times 10^{-06}$	10,92	11,46	↓	1
TUBB2A	ILMN_2038775	$5,73 \times 10^{-06}$	8,36	10,15	↓	1
TLR5	ILMN_1722981	$6,02 \times 10^{-06}$	7,27	6,96	↑	1
GNB2L1	ILMN_1736500	$6,47 \times 10^{-06}$	12,25	12,05	↑	1
CSORF41	ILMN_1776788	$7,17 \times 10^{-06}$	7,95	7,64	↑	2
CNOT6	ILMN_2136177	$8,05 \times 10^{-06}$	7,73	7,55	↑	1
TSPAN7	ILMN_2120695	$9,82 \times 10^{-06}$	10,18	11,68	↓	2
SYNM	ILMN_1712075	$1,02 \times 10^{-05}$	9,59	9,03	↑	1
PPARBP	ILMN_1721729	$1,15 \times 10^{-05}$	7,81	7,49	↑	1

2137 der nominal signifikanten Gene zeigten höhere, 1407 hingegen niedrigere Expressionslevel in AD im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Für 260 aller signifikant deregulierten Gene konnten sogar mehrere Marker gefunden werden (248 Gene mit zwei Markern, 10 Gene mit drei Markern und zwei Gene mit vier Markern). Die Deregulation der einzelnen Marker eines Genes erfolgt dabei in fast allen Fällen in die gleiche Richtung. Nur eine kleine Anzahl von Genen (C4ORF34, RUFY3, TUBA1C und VSP41) werden von je zwei signifikanten Markern repräsentiert, die entgegengesetzte Regulationsrichtungen aufweisen.

Insgesamt erreichten in der vorliegenden Arbeit nach Bonferroni Korrektur für multiples Testen 10 Transkripte genomweite Signifikanz ($p\text{-Wert} < 4,4 \times 10^{-6}$; Tab. 9), wobei für 9 Transkripte niedrigere Signalintensitäten in AD zu beobachten waren und für ein weiteres Transkript höhere Signalintensitäten. Unter den am stärksten in AD hochregulierten Genen konnten Marker für drei so genannte small nuclear RNAs - RNU1G2 ($p = 1,51 \times 10^{-09}$), RNU1-3 ($p = 4,37 \times 10^{-09}$), und RNU1-5 ($p = 1,55 \times 10^{-08}$) - gefolgt von Adipocyte enhancer binding protein 1 (AEBP1; $p = 9,74 \times 10^{-08}$), nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (NFKB1; $p = 1,44 \times 10^{-07}$), proteinkinase 2 (PKN2; $p = 6,34 \times 10^{-07}$), HMG box transcription factor 1 (HBP1; $p = 7,51 \times 10^{-07}$), CREB3 regulatory factor (C5ORF41; $p = 8,90 \times 10^{-07}$) und glial fibrillary acidic protein (GFAP; $p = 3,70 \times 10^{-06}$) detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigt der Marker für tetraspanin 7 (TSPAN7; $p = 3,32 \times 10^{-06}$) eine genomweit signifikante Herunterregulation in AD. Die logarithmierten Signalintensitäten dieser 10 Marker wurden für die einzelnen Proben getrennt nach AD und Kontrolle graphisch aufgetragen (Abb. 20).

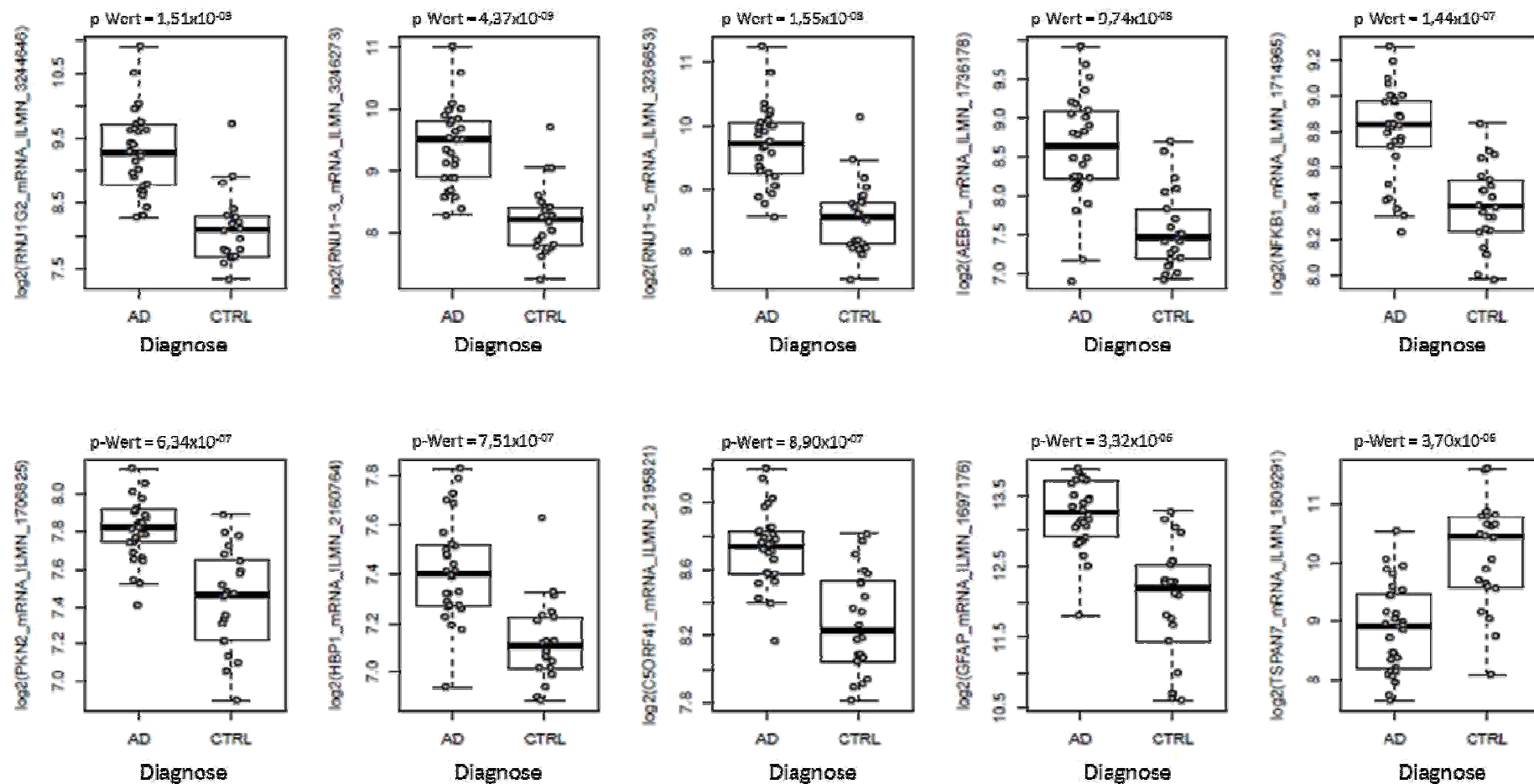


Abb. 20: Verteilung der mRNA Expressionslevels signifikant deregulierter Gene in Gehirngewebe von AD Patienten

Die Graphik zeigt die logarithmierten mRNA Signalintensitäten der Mikroarray-Analyse in humanem post-mortem PFC von 39 AD und 25 Kontrollproben. Alle signifikanten Marker mit Ausnahme von TSPAN7 sind in AD hochreguliert. Die angegebenen, unkorrigierten p-Werte sind nach Bonferroni Korrektur für 11264 Tests ($p\text{-Werte} < 4,4 \times 10^{-6}$) genomweit signifikant. Sie wurden mittels t-Test berechnet.

Vor kurzem publizierten zwei Gruppen Daten zur Genexpressionsanalysen in unterschiedlichen Genregionen in Alzheimer Patienten und gesunden Kontrollen. Chandrasekaran *et al* 2016 (Chandrasekaran & Bonchev, 2016) verwendeten für ihre Analyse Expressionsdaten aus zwei Probensets. Set 1: tangle-haltige vs tangle-freie Neuronen aus zehn entorhinalen Kortizes von AD Patienten mittleren Erkrankungsstadiums. Set 2: Gewebeproben aus der CA1 Region des Hippocampus von insgesamt 30 AD und Kontrollproben. Deren statistische Analyse identifizierte 214 signifikant differentiell exprimierte Gene. Puthiyedth *et al* 2016 (Puthiyedth et al., 2016) führten ihre Studie zur Genexpression in 6 Gehirnregionen (Entorhinaler Cortex (EC), Hippocampus (HIP), Mittlerer Temporaler Gyrus (MTG), Posterior Cingulate Kortex (PC), Superior Frontal Gyrus (SFG), Visual Kortex (VCX)) von 161 AD und Kontrollproben durch. In beiden Fällen wurden die Daten von anderen Arbeitsgruppen auf Mikroarrays der Firma Affymetrix analysiert und über die GEO Datenbank bezogen. Bei einem Vergleich der von beiden Arbeitsgruppen ermittelten signifikant deregulierten Gene mit denen der vorliegenden Arbeit zeigten sich deutliche Überschneidungen (Tab. 10).

Tab. 10: Schnittmenge deregulierter Gene aus der Literatur mit der vorliegenden Arbeit
Die betrachteten deregulierten Gene weisen in allen Studien mindestens einen p-Wert < 0,05 auf

Studie	Gehirnregion	Schnittmenge Gene
Chandrasekaran et al 2016	EC+HIP	68
Puthiyedth et al 2016	EC	587
	HIP	835
	MTG	966
	PC	24
	SFG	229
	VCX	98

Besonders deutlich ist die Überschneidung der differentiell exprimierten Gene der vorliegenden Studie mit 966 des mittleren temporalen Gyrus (MTG) der Studie von Puthiyedth, was etwa einem Drittel entspricht. Darunter finden sich mit AEBP1, TSPAN7 und GFAP auch drei der in der vorliegenden Arbeit am stärksten deregulierten Gene (Tab. 11).



Tab. 11: Schnittmenge der in der vorliegenden Arbeit identifizierten und in den Studien von Chandrasekaran *et al* 2016 und Puthiyedth *et al* 2016 beschriebenen, differentiell exprimierten Genen

Die Übersicht enthält alle sich zwischen den beiden Studien und der vorliegenden Arbeit überschneidenden differentiell exprimierten Gene, aufgelistet nach der Anzahl der Gewebe, in denen sie von Chandrasekaran *et al* 2016 und Puthiyedth *et al* 2016 als differentiell exprimiert identifiziert wurden.

Gen ID	in Anzahl Gewebe/Studie identifiziert
LMO4	7
RHOQ;BBX;CADPS;TCF12;PFDN5;BCL6;ZNF148;PDHA1;CALM1;DDR1;CKAP5;NIF3L1;YVHAZ;DTNA;OGFOD1;PTMA;WNK1;WWC1	5
TNPO1;SPG20;SLC44A1;TOB1;NDRG4;CHD1;AFTPH;C14ORF2;GNG3;NIPBL;OC1AD1;NFKBIA;AP3D1;SMAD5;GPI;LPP;FIG4;ATP6V1H;PPF1A1;CEP350;PALLD;UBE2N;YY1;PIAS4;TGFB3;ZNF609;ALMS1;POLR2C;CFAR;SNRNP;ADD3;LMO3;MDH1;ZAK;ATP2A2;;TTC3;NSF;PPP1R11;P PP1R7;;SERBP1;NBP10;TCF25;SH3GL2;;ENTPD6;VPS8;SUZ12;;HOPX;NPAS3;GNAS;PMP2;ZFP91;ARF1;EZR;PRDX6;LAMC1;PREPL;PME1;PDCD6;BSCL2;DPP6;ITSN1;APLP2;SNCA;GAPDH;AKIRIN2;ITPR1P2;HNRNPA0;SORBS1;RUFY3;TNFRSF10B;LARGE;IFNAR2;SAP18;MEX3C;MA ST3;MED16;ADSL;SARS;C19ORF43;H2AFY;LIFR;YTHDC1;CYB561;CRCP;UGCG;EPM2AIP1;GOT2;IRF2B2;HSD17B7;TRIM8;MIF;KDSR;SPTAN1;ALDH6A1;PHF3	4
SRGAP1;TRAP1;DDR2;ATP5J2;LSM4;ATP5G1;ATP1F1;IL13RA1;ABCA1;BRWD1;TP11;PFKM;NDUFV1;ATP6VOC;SCN2B;CTDSP2;FBXO32;AHNAK;NFE2L1;NDRG3;FAM127A;ATP6VOD1;PIN1;SEC11A;CDK2AP1;PHIP;CCDC136;BRE;ACTR1B;RYBP;GABBR1;MAPT;PTPRA;SLC25A4;TUBA1 C;ARF3;LETMD1;ADCY1;FAM107A;ITGB5;C6ORF136;CHD4;PRKCB;MKRN1;OTUB1;JMTT;PHF21A;TJP2;ASNS;APN26;DCTP1;MLLT11;THY1;PRDX2;ZNF395;IAH1;POLDI3;EP515;RPS27;PRPF4;BCL2;NAP1L1;GOLIM4;USP47;PATL1;BRD3;MYH10;B4GALT5;VCAN;POU3F2;POLR3H ;MANBAL;CXORF40A;NEO1;LMBR1;MKKS;ATP6V1F;KLHDC3;KPNB1;CAPRIN1;NFC;VPS13C;ATP6V0E1;METAP1;PFN2;KIF21A;KCNIP4;NAPB;EIF3B;MSRB3;FBXO11;KAT2B;PIPH;ANP32B;ACACB;RHBDF2;DNM11;IQSEC1;MRPS22;ARHGFE18;RBM15;IDH3A;CUTA;TROVE2;PLSCR4;S PAG9;MAP2K3;TMSB10;CCT2;DIP2B;HMG81;FXR1;SMARCC1;LRPPRC;SLC17A7;KCTD13;ZCCHC24;HPCAL4;GGNBP2;SPEN;C12ORF76;ACLY;ZCCHC17;PROSC;EIF3G;UBE2G1;MEG3;GFRA2;STK24;TSC2D22;PTP4A2;AIMP2;DTX3;TMEM189;SASH1;ABLIM1;EDF1;KHNYN;ACTG1;SM ARCC2;PSD3;YIPF6;NDUF47;SMAD4;GLO1;SUB1;MAP4K4;PSMA1;PPFIBP1;TAF15;MAP3K2;COPS8;NCOA3;H2AFX;FYN;L3MBTL2;FERMT2;SMOX;BMPR2;HIPK2;ST3GAL1;PVRL2;PPM1K;BCL11A;EFHD1;KLF15;IDH3G;KIF1A;NDUFB11;MATR3;KIAA0368;VPS41;NFIB;NSDHL;CANX;C RYZL1;UNG;UBE2L3;NDUF49;IFNGR1;KLF12;RUVBL2;ARMC1;PAIP2;CIRBP;CDC37;PSMB2;THRA;SPAG7;UBE2H;ICA1;BCCIP;MARCKS;CDKN1C	3
HBP1;LOC144438;APLNR;YEATS2;OLFM1;PGRMC2;KRCC1;C14ORF28;CHN1;MDH2;ACER3;GOT1;RPL14;ARHGEF10;PAPOLA;ATP5B;PITRM1;VEZF1;PPP2R2C;TBC1D7;SYNGR1;LSM14A;CISD1;CALD1;EEF1D;NRCAM;RPL5;CDK5R1;ETS1;NDUF53;WASF2;RIN2;BGN;AP4B1;FAM107B ;SV2B;NSL1;SPOP;SEZ6L2;RALGDS;NAV2;RBM17;LIMCH1;PISD;C16ORF45;TM9SF4;CSK;GLIS3;SLC7A2;ARPC5L;TPMT;CPLX1;YES1;KLC1;NRGN;RTN1;ENO2;ATP6V1G2;FLJ3396;RBM12B;HPCA;UCHL1;KIAA0513;GHITM;CRMP1;KTN1;PPP3CB;EGR1;RPS6KA5;SYF2;RNP51;ARL5A;P CMT1;ALDOA;MAP1LC3B;SERP2;MARS;YARS;ATP6V1D;PA4TM;CACNG3;VAMP2;RTN3;ENAH;SYT13;FAM131A;PRKX;FGR;AP2M1;LRPAP1;GLS;IFIT2;RBM39;TUBA4A;RPL3;ACO2;IQGAP1;SDHB;KLHL24;SCAMP5;TOR1A;MYO10;CAST;GNA12;NFIA;PPP1R2;TBL1X;PRRT1;ATP6V0A 1;ACOT7;TAGLN3;THOC2;PDE5A;ATOH8;DDX24;RYK;SNX14;COX6C;PARP6;SPATA7;BASP1;AP2B1;ETV6;LCOR;KANK1;TRIM9;LGI1;PRKCZ;RPL4;TXLNA;LEPR;GNB1;YWHAG;STAU2;SCRIB;PAFAH1B1;CLIP3;MAN2A1;LMNA;HSPA12A;ASMTL1;BTBD10;PSMB7;SERF2;FAM133B;NDP1P 1;RP56;QKI;MYOM1;H3F3B;EFNA1;VPS35;ZBTB20;YVHAH;RA6B8;SPATS2L;ZBTB34;AAKSD11;HMGCR;GATAD2A;ZNF462;NDE1;LMO2;NAE1;ARL1;LDOC1;TAX1BP3;RPA1;PSMD1;EPB41L4B;EIF4G3;MPP1;SSPN;DAAM1;TMEM47;KCNAB1;MT1F;PACS IN1;ANKRD13D;WDR54;DPSY14;F11R;MYLK;TERF2IP;CCNG1;G3BP1;ANLN;VGLL4;LOC728153;C11ORF58;TM2D3;CAMTA1;TRIM13;KPN1;COG2IT11;LOC642361;CTNS;MAP2K4;RRAS;ZHX1;EVL;SLC25A14;TRIOBP;WASL;MT2A;DDAH2;TOLIP;CMAS;MAPK35;PRPS1;MYLIP;EEF1 A2;SP110;MXD4;MAPK100;SP4;POLR1D;C1ORF21;MCM3;CUL4A;EEF1A1;INO80D;SLC41A3;GRIA2;KIF14;TRAK1;THY1;SPRYD3;ANKRD46;UOCRF51;SS18;HIF1A;DARS;DDX10;RAB22A;GAS7;TM7SF2;CAPN51;REEP5;GNL3L;PTAR1;XCCL16;ELF2;FAM134A;NOL4;A RL6P1;SNX5;ARPC1A;EFR3A;SYN1;MADD;UZAF2;FGFR1OP2;COG3;KHSRP;YPEL5;RPS8;UBE4B;EIF5B;DCTN6;PGLS;ATP6V1C1;ERH;RBBP6;PITPNB;GNPTAB;MBD6;ACTB;RHBBD2;PLSCR3;KCNK1;QPR7;RAP1GDS1;PDPK1;CLIC4;GPN1;REV1;ATP2C1;WDR20;AKT1;DSTYK;STK4;APH 1A;NCK1;LRP10;PTPN4;PDCD4;TNRC6A;ANK2;GOLGA7;IFRD1;PARP10;C20ORF194;PRMT2;SIRPA;CAMK2B;SNRPA1;RRAGA;MMD;PML;PACS2;DYNLRB1;DPP9;VPS13B;LEPROT;BMI1;TK2;COX5B;NEFL;DDIT4;OAS2;TARDBP;PFKFB3;EXOC3;SLC35B4;TCP1;CMPK1;NEBL;LAPTM4B; SSB;CBX3;FAM20B;METTL7A;ZMAT3;APEX1;ZNF532;ARHGAP1;FARP1;CAMK2A;SNAP25;EIF4E3;NPTX1;C12ORF10;VPS29;ATP5SL;ARL8B;PDXDC1;MRPL47;PMEPA1;ELK1;DENND5B;LEMD3;ACVR1B;MED19;MRPL15;DICER1;ABAT;NR2F1;TXNDC15;ZNF365;NUMB;JAM3;NUP133 ;MIER1;ANAPC13;SHB;NTSDC3;MAP6;CRELD1;PEX19;KLF6;CNPY2;HABP4;MTX3;TUB;SDCA;DCLRE1C;ICAM2;CCND2;INTS4;NDUFV2;CHST12;BCAP29;H2AF;SYAP1;TOMM34;H1FX;TOP2B;APPL1;VPS45;MGEA5;CAB39;RPS6KA2;SLC2A1;N4BP1;WARS;TMEM123;VPS28;STOML1; NPEP5;MTHFD2L;LAMP1;TCFL5;EIF4G1;EXOSC1;ACSL1;CDAN1;PLEKHB2;ISCA1;ALS2;WIP1;RPL17;RNF144A;SLC25A37;ERGIC1;UBXN4;MED14;FNBP1;MSL3;RASSF2;KCNMA1;PWP1;ANKRD28;AEBP2;TNFRSF21;ZNF652;PDK4;GLG1;GRAMD3;ZNF562;PPP1R9A;PIP4K2A;MCFD2; MEF2D;CAMKK2;APP;EIF3K;HNP2;MAPRE3;PCNX;BRD7;ELMO1;SEMA6A;GNMT;ADIPOR1;SLC7A1;MCP2B;DIP2C;MAP18;ZEB2;DCAKD;MIF4G;SCAMP1;CGGBP1;IL11RA;GDE1;PCM1;PCMTD1;UNKL;RPS20;NDUFA6;TCEB2;ACADM;SDHC;CES2;FHL1;C7ORF55;ATP1B1; PRKAR1A;ARPC4;ZMYM3;DYNC1H1;SNHG9;CLN8;TSPAN5;MRPS15;TSPAN31;TM2D1;COPE;TATDN3;ERMN;NOP56;GPX4;TRAK2;COO9	2
AEBP1;PKN2;TSPAN7;GFAP; MAP1LC3A;TUBB2A;TLR5;CNOT6;SLC38A2;CMTM3;CFL1;FAM89A;PAK2;ITPKB;STX12;EIF3F;TUBG2;CS;CAMK2G;SP1;ITGB1;S100A6;RPL11;ETF1;IDH3B;ZBTB40;CREB3L2;AK1;ANTXR1;FXYP5;SLC35A2;RASL12;RNMT;CORO1C;DDIT4L;NCALD;IGFBP5; KIFAP3;PTTG1IP;ATPAF1;CASC3;DAB2;ST13;CDK5;CRY1;STX1A;RNFT2;ZNF281;MSN;GPRASP2;TUBB3;PIAS2;GIMAP7;APBB3;NHP2L1;CALM3;SLC16A9;VSNL1;CNRP1;PLOC2;RPS3;FHL2;NES;BAI3;ATP5F1;RPL13;NAP1L5;PDHB;TP53INP1;CCK;SRGAP3;TAOK1;TRO;TSPYL2;TSPOT; TBC1D2B;SMS;GCC1;IQCK;NEDD8;HS1BP3;UGDH;GNA13;SLC35B1;DCTN3;ARF5;ZSWIM6;MSH6;PHB;CAP2;POLR3A;RNF130;HMP19;FBL;ZFAND2A;ALKBHE;STMN2;CARHSP1;LONP2;HMGCS1;PTBP1;OGDHL;SERTAD2;SORBS3;CHMP4B;MTMR3;MOAP1;BEX2;SDHA;STMN3;ID3;ZZ Z3;TCEAL2;C1ORF216;UPF2;MAGED1;CNKSR3;RAB1A;JL10RB;PTRF;MYL12A;LRRC20;PLEKHB1;NGFRAP1;ATP6V1E1;PFDN1;GABARAPL1;HAGH;INTS3;VBP1;OSBPL2;SPCS1;ATG4A;CA10;AP1S1;RELL1;MAPRE1;DNAJB6;DENND5A;EPDR1;NDUFA4;GPM6A;HK1;RAPGEF4;ATP1B3;A POO;ERF;NME1;TUBG1;C3ORF14;MRPS11;RPP40;NQO2;SRA1;ATP6V1A;PDPN;ZC3H12C;ATP50;RFC1;LINGO1;FLNC;PPP2CA;CLIC1;CAMLG;CCDC151;MAP2K1;HPRT1;RABEPK;ZHX3;ATP5H;DUSP28;TTC19;SCG5;HIGD1A;FOXO1;CHCHD2;ARRB1;DCAF6;FXDY6;PNMA2;RARS2;ZNF 175;FYTTD1;SERPINB6;NUP1F2;KLHDC9;VDAC3;AP2S1;HDAC1;RBPJ;FBXW7;ANXA2;CDC26;SENP5;ATP1A1;UBAP2L;PLEKHH3;STAT5B;SEPHS1;TPM2;CFB;ACTR10;STAT1;CMTM7;HMG20B;CRTAP;YVHAH;FAM181A;RPAIN;ATP6AP1;UQCRC1;EIF4A2;NECAP2;ZNF689;HEY2;TSSC1; C1ORF52;SLC22A17;MTSS1L;SP3;ZNF544;RFX1;APBA3;COBL;AFG3L2;GAP43;BRPF1;PCDH9;RAB11F1P2;PLCL2;ATP6AP2;RPS15A;GLOD4;POGK;LARP4;CACNB3;LTBP3;H2AF;TCEAL3;LAPTM4A;B4GALT7;COX6A1;TPRG1L;ATP5L;SNHG6;SDAD1;SH3BGR12;RAB6A;HDAC4;FUNDCl;CTNN1;CCFL5;EIF A1BP2;RPL13A;ADIPOR2;PPP3R1;CAMKV;LASS6;C11ORF49;PTS;PAK4;LDB2;ZNF641;CD83;RPS27A;C1QB9;PHF2;NUMA1;CYP46A1;STK11;SMAP2;PBXIP1;ECE2;RPL23;COX5A;CSRP1;BSN;BST2;AK2;PREX1;CUEDC2;ACYP1;SGK1;SLC20A1;BAZ1B;TUBB;AIDA;LYSMD2;LGALS3;MTX2 ;VAMP4;USP11;MTIF3;RPN2;GIMAP8;HIVEP2;TAPT1;C15ORF52;HIST1H1C;RPS17;CLSTN1;ATP6V1B2;IGF2BP2;NISCH;RPS28;ZBTB47;PRPF19;COQ3;USP33;KATNB1;SYNJ2BP;CYCS;VAMP1;ZNHIT3;DKC1;OCLR;TTC9B;RAB23;IKZF4;BRMS1L;TMEM9;COQ10B;NUDT14;PLXNB1;RPS 19;TMCC2;ATXN1;UBE3C;ATG16L1;AK5;SRP54;ITGB1BP1;KIAA1644;MEGF10;RANBP1;CEBPD;PHF19;PLM2;C2NNM3;ADIPOR1;DGOUK;CUEDC1;C9ORF156;ATP13A2;HAUS4;PAM;C19ORF70;AATF;FBLN1;SNAP91;EIF2AK1;JAG1;TAF6L;TOMM20;DDX1;PAK1IP1;RTN4;NDUFAB1; SELT;FRYL;FAM181B;KLHDC1;RPNP;NME6;RPL18A;PLCH2;DENND2A;EFEMP2;NAB1;RHEB;LAMB2;PLD3;VWVA1;FAM173A;DTX2;HSP90AB1;ZBTB16;SFBMT2;TCEAL3;LAPTM4A;B4GALT7;COX6A1;TPRG1L;ATP5L;SNHG6;SDAD1;SH3BGR12;RAB6A;HDAC4;FUNDCl;CTNN1;CCFL5;EIF 3A;DHCR7;CORO1A;RUND2;CRBP1;BTF3L4;ANXA5;LARP7;NHP2;STX2;ADARB1;SLC25A44;TNS3;FMNL2;DDX27;FNDG5;CALM2;PPM1B;SAR1A;NDUFA11;H2AF12;EEF1F;TRIM4;AP5L;R1CB8;TXNIP;SV2A;TMEM1268;AKTIP;NOTCH3;RAB3GAP2;LRRCC1;SAP30L;NUDT15;ARHGEF4; MRPL37;ZCRB1;GON4L;NDUFAF1;LOC389895;LRRC32;TMEM132B;TFG;FARSA;MKNK2;SMG5;MRPL32;GARS;ZNF573;G3BP2;APOC1;EIF2AK2;SEPN1;COX6B1;UGP2;GIN1;ZNF581;UQCRR;B3GALNT1;ATP6VB9;MYL6B;ENY2;SCAMP3;UNC119B;TMEM158;PHACTR3;VCP;C16ORF5 8;ATP9A;ABHD14A;RCAN2;KRTCAP2;USP1;CCDC149;DNAJC27;BAIAP2;CHCHD10;EHD2;TMEM160;CASP2;RAB40C;NDRG1;UQCRC2;CHD8;SUCLG2;RNF114;LY6E;SHOC2;KLHL5;COIL;INPPL1;DENND4C;PKIA;CHDH;CAB39L;HEG1;BNIP2;DUSP18;ZBTB43;TMX1;SORBS2;TMEM120A ;COX7A1;NUP188;NDUF54;EMX2;IGF2R;DDT;SPARC;TUBA1B;TERF2;TOMM70A;NET1;MGLL;ITPR3;ZFP358;COX7A2;BBS7;EML3;KLF2;MTMRA;SLC25A5;RHOU;PHACTR4;NOTCH1;STOM;ZFP36L1;DNAJA3;EDN1;PLXNB2;MAP4K5;STAT3;CD99L2;C1ORF4 6;XRN1;RNF123;SLC6A8;RAB31;MCL1;NARS;FH;C17ORF85;C10ORF116;RPL7;COX7A2L;SLC23A2;AMMECR1L;CNN3;VWF;TAP1;KCNJ10;ZHX2;ARID4B;DNAJC30;ZNRANB2;PEX6;BOK;SVT4;PCF11;SLC6A1;RECOL;NTM;PTH1R;RBM5;TOR1AIP1;GADD45B;GGPS1;DYNLL1;RAB8A;SAP3 OBP;MBD3;ZMAT2;DPY30;UQCRR;RHOA;CBY1;HINT1;AMZ2;C1ORF123;LG14;UBE2E1;GAB2;AGGF1;RCC2;KIF5C;PSMC1;RPS2;FGF9;GJA1;DCTN1;PSMB6;TRAPP6B;SDHAF1;CCDC115;SOD1;AHDC1;PGP;MRPS21;COX19;ACSF2;VASH1;DENR;CSTF3;ARGLU1;RHOB;ZBED1;ZFHX3;E NTPD3;BAZ2B;NKK2- 2;PRKCOBP;SCD5;GNS;USO1;NLK;RIPK1;PTPN11;TNFRSF19;IDI1;SETD3;NEURL1B;TEX261;ZFR2;CAMK2N1;SERGEF;COPS3;SAP30;C1ORF115;DNAJA2;RPRD1A;MPP2;CCDC125;EBAG9;CCNDBP1;POLD2;STMN1;RAF1;HSPH1;ERAL1;CALU;FAT1;NUDT1;CLDND1;ST3GAL5;ARNT2;D NAIC7;RFX5;XAF1;MEA1;STOML2;PCDH19P;FOXJ2;ASB8;COPS5;SLC35E1;KCNQ2;ANGEL2;TNFRSF14;DKK3;RIMS3;PRPSAP2;LZFTL1;DYNLT3;STAR10;CD59;CYBRD1;AKR7A3;ASB6;MFS6;C4ORF34;WDR26;DYRK2;PSMA5;FEZ2;C3ORF10;TMED7;KLHL22;SOC5A;MCOLN1;ILKAP ;BCAN;OGT;CD99;ANXA7;RPA3;NXN;IL1RAPL1;RSL24D1;LPAR1;ZNF264;VPS26B;UBA7;FAIM2;TYK2;FGF1;PARP9;SLC44A2;TTYH2;SDF2L1;GPAM;CADM2;PDE9A;RPS4X;NPDC1;PAFAH1B3;ARHGAP21;PANK2;TSPAN3;TRIO;CLEC14A;SRC;NFATC3;GLTP;PAX6;ATP50;CPOX;NUAK1; DMWD;NOLB;PAPSS2;C1ORF54;MESP1;KIAA2013;FAU;UQCRO;OMG;ARHGEF3;NDUFA2;LGL1;DSEL;DRG1;MFAP1;SRPRB;BAG3;LIX1;FAM175A;RALB;SLC1A2;MTT1E;C15ORF57;ERMP1;TSEN34;MRPS12;TAF10;ABCC5;PPA1;FGF2;SRP68;ZNF385A;SYPL1;NOP14;RHPN2;C17ORF5 8;MEF2C;PHLPP1;MFSD11;SNRNP27;CXXC1;PLEKHM1;IL17RC;ZNF160;RAPGEFL1;IFI27;CCDC53;DUSP16;LIMS1;C21ORF58;NEDD4L;CNP;RPS15;UBR4;TRIL;STRADA;FINDC3B;BR13;ACP2;SAMD4B;WAS;NUCB2;ABR;PRELID1;PPP1R10;C20ORF24;DCXR;ASH2L;KLHL3;NDUFB1;HLA- DMB;HLA-A;HLA-E	1



4.3. Analysen zur Identifikation potentieller miRNA-mRNA-Interaktionen

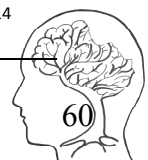
miRNAs machen etwa 1-2% des humanen Genoms aus und regulieren ~50% aller protein-kodierender Gene via post-transkriptioneller Regulation durch Bindung an komplementäre Sequenzen vorwiegend im 3'UTR Bereich mRNAs. Sie sind in dieser Funktion an einer Vielzahl entscheidender zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt und haben daher auch Einfluss auf die Entstehung unterschiedlicher Erkrankungen. Da die Bindungen zwischen der miRNA und der Zielsequenz nicht perfekt sein müssen um eine Regulationsmechanismus in Gang zu setzen, kann eine miRNA sehr viele verschiedene Interaktionspartner haben und umgekehrt kann ein Transkript durch viele unterschiedliche miRNAs reguliert werden. Die Interaktion des in der vorliegenden Arbeit in AD genomweit signifikant herunterregulierten miR-132/212 Clusters mit potentiellen Zielgenen ist daher von besonderem Interesse und soll im Folgenden näher analysiert werden.

Dazu wurde zunächst die Literatur nach bereits validierten Zielgenen des miR-132/212 Clusters durchsucht und diese Daten mit den hier ermittelten signifikant deregulierten Genen abgeglichen. Unter den differentiell exprimierten Genen fanden sich 19 der 47 in der Literatur für miR-132/212 beschriebenen validierten Zielgene, die in die gleiche Richtung dereguliert gefunden wurden. 9 der Gene zeigten eine geringere, 10 eine höhere Expression in AD im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (Tab. 12).

Tab. 12: In der vorliegenden Studie identifizierte und in der Literatur validierte Zielgene des miR-132/212 Clusters

p-Werte der 10 hoch- und 9 herunterregulierten Marker die zu Genen gehören, welche bereits als validierte Zielgene des miR-132/212 Clusters in der Literatur beschrieben wurden und in der vorliegenden Arbeit in gleicher Richtung dereguliert waren (Boudreau et al., 2014; Lau et al., 2014; Wanet, Tacheny, Arnould, & Renard, 2012).

Gen ID	Marker ID	p-Wert t-Test	Trend in AD	Anzahl signifikanter Marker	Trend in Literatur	Literatur
JARID1A	ILMN_1786920	2,38x10 ⁻⁰⁵	↑	1	↑	Wanet <i>et al</i> 2012
ITGB1	ILMN_1723467	5,53x10 ⁻⁰⁵	↑	2	↑	Boudreau <i>et al</i> 2014
SIRT1	ILMN_1739083	2,69x10 ⁻⁰⁴	↑	1	↑	Wanet <i>et al</i> 2012
ATP6V1H	ILMN_2403730	3,13x10 ⁻⁰⁴	↓	1	↓	Boudreau <i>et al</i> 2014
RICS	ILMN_1722726	7,03x10 ⁻⁰⁴	↓	1	↓	Wanet <i>et al</i> 2012
FOXO1	ILMN_1738816	1,33x10 ⁻⁰³	↑	1	↑	Lau <i>et al</i> 2014
TJP1	ILMN_1691499	1,83x10 ⁻⁰³	↑	2	↑	Wanet <i>et al</i> 2012
GNB1	ILMN_1760320	1,84x10 ⁻⁰³	↓	1	↓	Boudreau <i>et al</i> 2014
NEO1	ILMN_1696702	1,85x10 ⁻⁰³	↑	1	↑	Boudreau <i>et al</i> 2014
QKI	ILMN_1773485	2,25x10 ⁻⁰³	↑	1	↑	Boudreau <i>et al</i> 2014
CETN3	ILMN_2224031	2,49x10 ⁻⁰³	↑	1	↑	Boudreau <i>et al</i> 2014
RASA1	ILMN_1725312	2,53x10 ⁻⁰³	↓	1	↓	Boudreau <i>et al</i> 2014
ANLN	ILMN_1739645	4,32x10 ⁻⁰³	↑	1	↑	Boudreau <i>et al</i> 2014
RTN4	ILMN_1730611	5,01x10 ⁻⁰³	↓	1	↓	Boudreau <i>et al</i> 2014
GPR116	ILMN_1728785	1,15x10 ⁻⁰²	↑	1	↑	Boudreau <i>et al</i> 2014
TJP1	ILMN_2403006	1,98x10 ⁻⁰²	↑	2	↑	Wanet <i>et al</i> 2012
BMPR2	ILMN_2070896	2,14x10 ⁻⁰²	↓	1	↓	Boudreau <i>et al</i> 2014
RB1CC1	ILMN_1736796	3,20x10 ⁻⁰²	↓	1	↓	Boudreau <i>et al</i> 2014
ITGB1	ILMN_1714820	3,56x10 ⁻⁰²	↑	2	↑	Boudreau <i>et al</i> 2014
MAP1B	ILMN_2377900	3,80x10 ⁻⁰²	↓	1	↓	Boudreau <i>et al</i> 2014
PAIP2	ILMN_1784753	3,95x10 ⁻⁰²	↓	1	↓	Wanet <i>et al</i> 2012



Um neben den bereits bekannten noch weitere mögliche Zielgene unter den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zu identifizieren, wurden die Expressionslevels der genomweit signifikanten miRNAs – hsa-miR-132-3p und hsa-miR-212-3p – mit den Expressionslevels der 10 ebenfalls genomweit differentiell exprimierten Transkripte aus den temporalen Kortizes der MUC Kohorte korreliert. Die Ergebnisse der linearen Regression sind in nachfolgender Tabelle (Tab. 13) zusammengefasst.

Zwischen den Expressionslevels dieser 10 Transkripte und den beiden miRNAs zeigen sich relativ starke Korrelationen, die für GFAP, AEBP1 und TSPAN7 sogar genomweite Signifikanz erreichen.

Tab. 13: Korrelation der genomweit signifikant deregulierten mRNAs mit hsa-miR-132-3p und hsa-miR-212-3p Expressionslevels aus temporalen Kortizes der MUC Kohorte

Expressionslevels genomweit signifikant deregulierter mRNAs (9 hoch- und 1 herunterreguliert in AD) wurden mittels linearer Regression mit den Expressionslevels genomweit signifikant deregulierter miRNAs korreliert. Angegebene p-Wert wurden nicht korrigiert. Mit ^(‡) markierte p-Werte bleiben auch nach Bonferroni-Korrektur für 11264 analysierte Marker genomweit signifikant ($p\text{-Wert} < 4,4 \times 10^{-06}$).

Gen ID	t-Test Diagnose~mRNA p-Wert	Trend in AD	miR-132/212 vorhergesagte Zielsequenz	lineare Regression mRNA~hsa-miR-132-3p		lineare Regression mRNA~hsa-miR-212-3p	
				p-Wert	R ²	p-Wert	R ²
RNU1G2	1.51x10 ⁻⁰⁹	↑	-	6.49x10 ⁻⁰⁵	0.276	1.54x10 ^{-07(‡)}	0.447
RNU1-3	4.37x10 ⁻⁰⁹	↑	-	9.88x10 ⁻⁰⁵	0.264	7.27x10 ^{-08(‡)}	0.464
RNU1-5	1.55x10 ⁻⁰⁸	↑	-	1.12x10 ⁻⁰⁴	0.260	1.15x10 ^{-07(‡)}	0.453
AEBP1	9.74x10 ⁻⁰⁸	↑	-	1.79x10 ^{-07(‡)}	0.423	7.56x10 ^{-08(‡)}	0.463
NFKB1	1.44x10 ⁻⁰⁷	↑	hsa-miR-132-3p	1.03x10 ^{-07(‡)}	0.435	1.17x10 ⁻⁰⁵	0.338
PKN2	6.34x10 ⁻⁰⁷	↑	hsa-miR-132-3p hsa-miR-212-3p	1.78x10 ⁻⁰⁴	0.247	7.11x10 ⁻⁰⁶	0.352
HBP1	7.51x10 ⁻⁰⁷	↑	-	8.84x10 ^{-08(‡)}	0.439	4.80x10 ⁻⁰⁵	0.300
C5ORF41	8.90x10 ⁻⁰⁷	↑	hsa-miR-132-3p hsa-miR-212-3p	4.39x10 ⁻⁰⁴	0.221	2.02x10 ⁻⁰³	0.185
TSPAN7	3.32x10 ⁻⁰⁶	↓	-	8.76x10 ^{-08(‡)}	0.439	3.93x10 ^{-07(‡)}	0.425
GFAP	3.70x10 ⁻⁰⁶	↑	hsa-miR-132-3p hsa-miR-212-3p	5.14x10 ^{-09(‡)}	0.458	1.93x10 ^{-08(‡)}	0.493

Aufgrund der Ergebnisse dieser rein statistischen Analyse wurden die zugehörigen Transkripte mittels eines im Internet frei verfügbaren Vorhersageprogramms miRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), welches vergleichend mehrere Algorithmen verwendet, auf potentielle miR-132/212 Bindestellen untersucht. In den Transkripten von PKN2, C5ORF41 und GFAP konnten Bindestellen für miR-132 und miR-212 identifiziert werden, wohingegen das NFKB1-Transkript lediglich Bindestellen für hsa-miR-132-3p aufwies.

Erwähnenswert ist, dass die Transkripte von GFAP und NFKB1 als einzigste, eine genomweit signifikante Korrelation zeigen, im Vergleich zur miRNA in AD hochreguliert sind und gleichzeitig auch Bindestellen für mindestens eine der miRNAs beinhalten. Um auszuschließen, dass es sich bei den Korrelation in diesen Fällen nicht um einen Outlier getriebenen Effekt handelt, wurden die Expressionsdaten für miR-132/212 unabhängig von der Diagnose exemplarisch gegen die jeweiligen Signalintensitäten der Transkripte für GFAP und NFKB1 aufgetragen (Abb. 21).



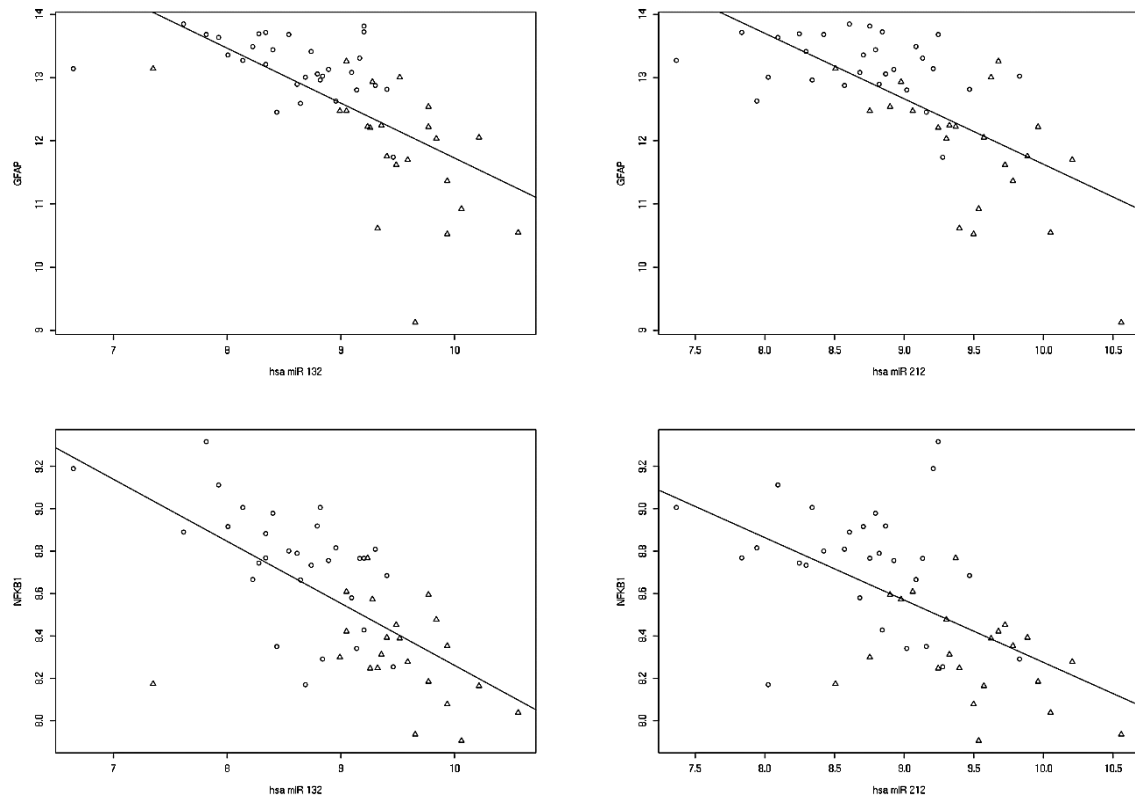


Abb. 21: graphische Darstellung der Korrelation von GFAP sowie NFKB1 mit miR-132/212

Die Diagramme illustrieren die logarithmierten mRNA Signalintensitäten in Abhängigkeit der logarithmierten Signalintensitäten der miRNAs für AD (Kreise) und gesunde Kontrollen (Dreiecke).

Für die so vorhergesagten miRNA-mRNA-Interaktionen wurden zusätzlich mittels RNAHybrid, einem ebenfalls frei verfügbaren Alignment-Programm, analysiert. Dabei wurden jeweils die 3' UTRs der vier Transkripte auf Komplementarität mit den beiden reifen miRNA Sequenzen untersucht. Die entsprechenden miRNA-mRNA-Strukturen mit der jeweils besten minimalen freien Energie (mfe) sind in nachfolgender Abbildung (Abb. 22) graphisch dargestellt.

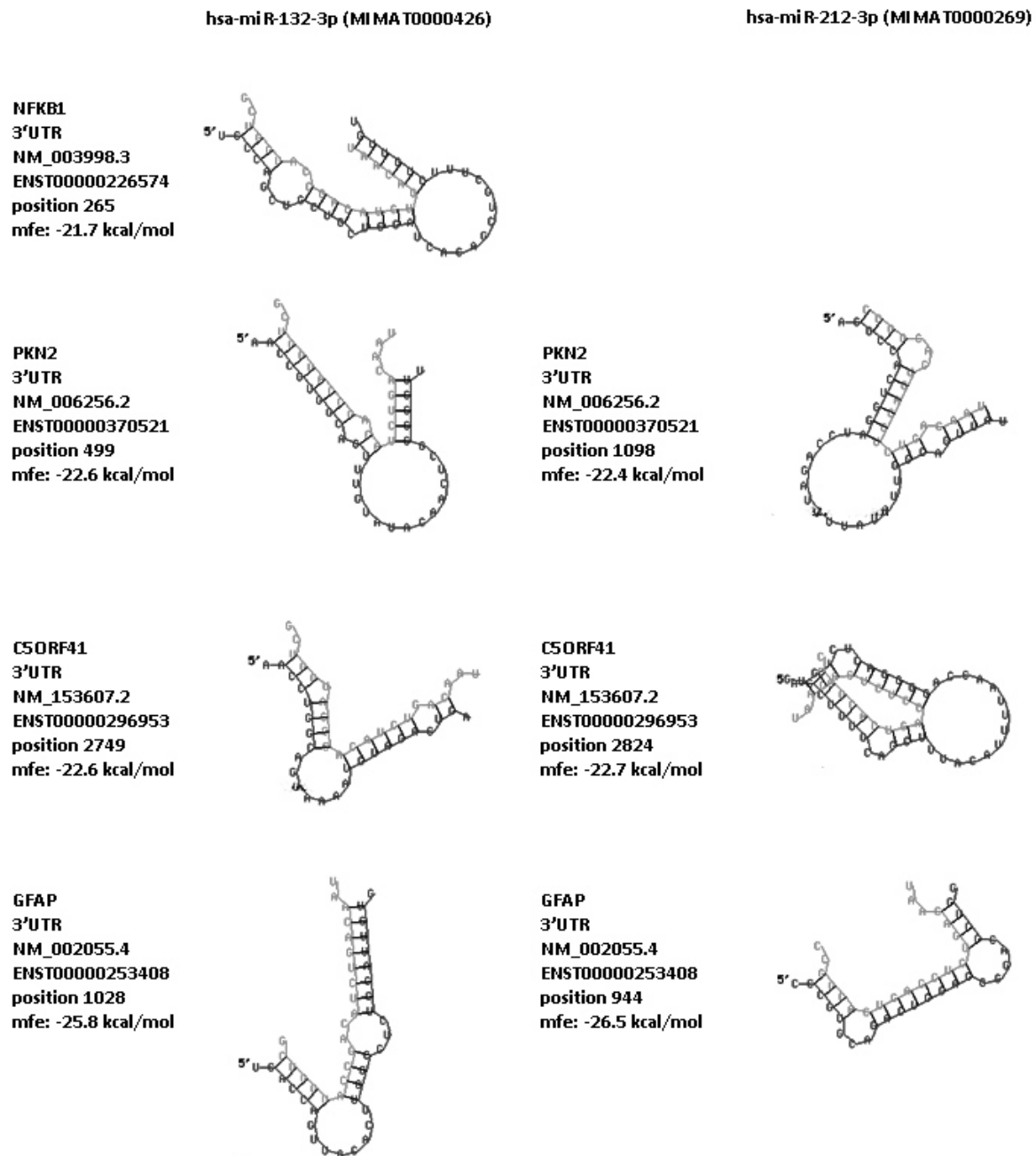


Abb. 22: miRNA-mRNA-Strukturen mit der jeweils besten minimalen freien Energie (mfe)

Graphische Darstellung der vorhergesagten miRNA-mRNA-Strukturen im jeweiligen 3'UTR der vier mit dem miR-132/212 Cluster korrelierten Transkripte mit der jeweils besten minimalen freien Energie (mfe) mittels RNAHybrid. Der schwarze Strand entspricht der 3'UTR Sequenz des analysierten Transkripts, während der graue Strand die Sequenz der reifen miRNA darstellt.

Aus diesen Analysen resultieren demnach insgesamt vier potentielle neue Zielgene für die in den temporalen und präfrontalen Kortex von AD Patienten signifikant herunterregulierten microRNAs hsa-miR-132-3p und hsa-miR-212-3p, die für weitere Analysen von Interesse sein könnten.

4.4. Analysen in Maus- und Zellkulturmodellen für Morbus Alzheimer

Die Analyse potentieller miRNA-mRNA-Interaktionen *in vivo* sowie funktionellen Studien bedürfen geeigneter Modelle mit ausreichend Bezug zu Morbus Alzheimer. Hierzu kommen insbesondere entsprechende Alzheimer Mausmodelle in Betracht, die die für die Erkrankung charakteristischen zellulären Veränderungen wie die Bildung von Amyloid-Plaques und Neurofibrillen ausprägen. Ein solches Mausmodell bietet eine gute Möglichkeit die Expressionsveränderungen auf miRNA und mRNA Ebene über den Verlauf der Erkrankung in größeren Fallzahlen zu analysieren und so die Daten aus den vorangegangenen Experimenten zu verifizieren. Zudem lässt ein Mausmodell eine schnellere RNA-Präparation aus den Geweben zu, was der RNA Qualität und damit insbesondere den Genexpressionsdaten zu Gute kommt, da RNAs mit zunehmenden post-mortem Zeiten durch im Gewebe vorhandene RNasen degradiert und somit aus dem Pool der analysierbaren RNAs entfernt werden. Des Weiteren ist bekannt, dass das miR-132/212 Cluster zwischen verschiedenen Spezies, insbesondere zwischen Mensch und Maus, stark konserviert ist (Wanet et al., 2012).

Aus diesem Grund wurden die Expressionslevels des in humanem Gehirngewebe signifikant deregulierten miR-132/212 Clusters in zerebralem Kortex und Hippocampus des von Frank LaFerla gezüchteten triple-transgenen Alzheimer-Mausmodells (3xTg; PS1_{M146V};Thy1.2-APP_{Swe}; Thy1.2-tau_{P301L}) und Kontrollmäusen (VERWEIS Tabelle Materialteil) im Alter zwischen 3 und 21 Monaten mittels semiquantitativer real time PCR untersucht. Die zugehörigen dCT-Werte für beide miRNAs sind in nachfolgender Abbildung (Abb. 23) graphisch aufgetragen.

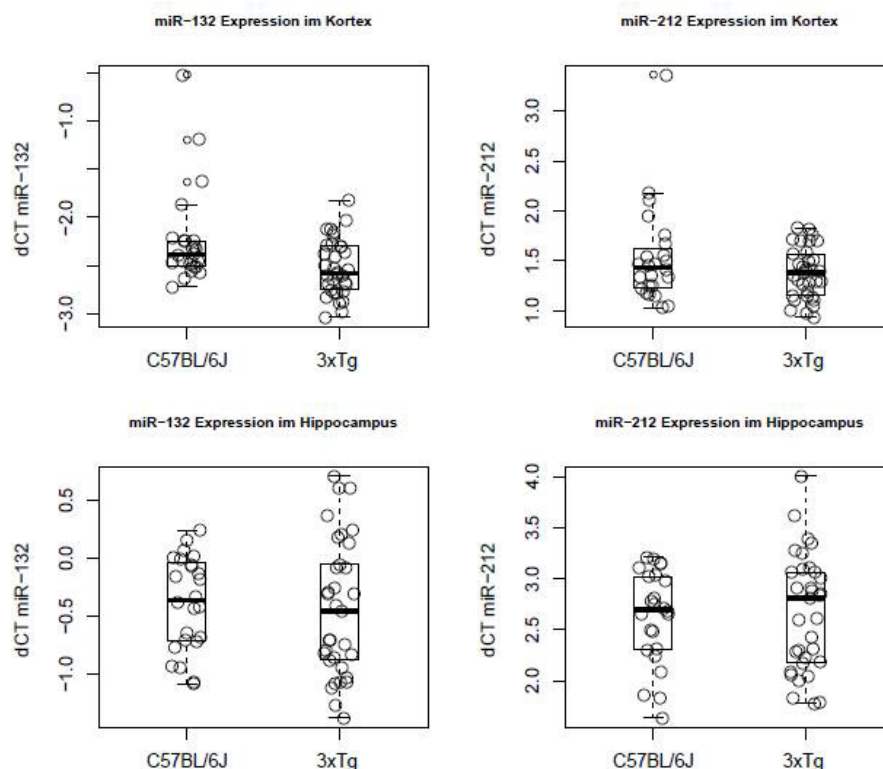


Abb. 23: Verteilung der mittels semiquantitativer real time PCR gemessenen miR-132/212 Expressionswerte in zerebralem Kortex und Hippocampus von 3xTg und Kontrollmäusen

In den Diagrammen sind in beiden untersuchten Gehirnregionen keine Expressionsunterschiede für miR-132 und miR-212 zwischen 3xTg Mäusen und den Kontrollmäusen zu beobachten. Die mittels t-Test berechneten p-Werte waren mit Ausnahme des p-Wertes von miR-132 in zerebralem Kortex nicht signifikant (Kortex: $p_{\text{miR-132}} = 0,018$ und $p_{\text{miR-212}} = 0,176$; Hippocampus: $p_{\text{miR-132}} = 0,677$ und $p_{\text{miR-212}} = 0,775$). Zusätzlich wurden die dCT-Werte für miR-132 aus den zerebralen Kortizes der Tiere nach Diagnose getrennt über die verschiedenen Altersstadien aufgetragen (Abb. 24).

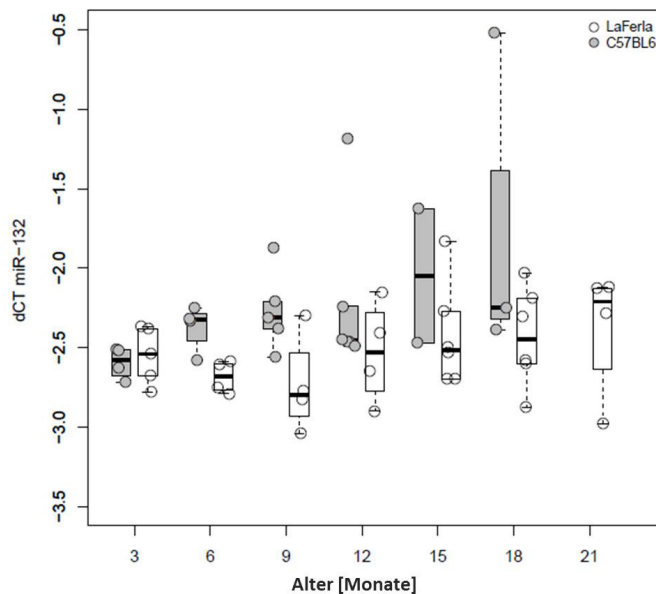


Abb. 24: Graphische Darstellung der dCT-Werte für miR-132 in 3xTg und Kontrollmäusen nach Alter

Hier ist zu erkennen, dass die miR-132 Expression in zerebralen Kortizes der 3xTg Mäuse über die Altersstadien hinweg um einen Mittelwert schwankt. Einige der 12-18 Monate alten Kontrollmäuse zeigen von ihrem jeweiligen Mittel stärker abweichende dCT-Werte. Diese beobachtete Abweichung einzelner Datenpunkte (Ausreißer) führen zum zuvor beschriebenen signifikanten p-Wert für die miR-132 Expression gegen die Diagnose. Die Daten des Alzheimer Mausmodells decken sich nicht mit den Ergebnissen aus den humanen Gehirngeweben.

Eine Alternative zum Mausmodell stellen humane Zell-Linien dar.

4.5. Manipulation des miR-132/212 Clusters in humanen Zell-Linien durch Transfektion

In der vorliegenden Arbeit wurden HEK293T Zellen und SH-SY5Y Zellen mit Plasmiden der Firma GeneCopoeia (Materialteil 2.14) zur Manipulation des miR132/212 Clusters transfiziert. Die hierzu verwendeten Plasmide der Firma GeneCopoeia kodieren entweder für eine der beiden precursor-miRNAs zur Überexpression der jeweiligen miRNA in den transfizierten Zellen oder für eine der beiden Antisense-Sequenzen, die die jeweilige miRNA in der Zelle abfängt und so artifiziell die Konzentration der entsprechenden miRNA in der Zelle senkt (Knock-down). Parallel wurden HEK293T und SH-SY5Y Zellen (Neuroblastomlinie) unter Verwendung von Lipofectamin2000 mit entsprechenden Plasmiden für hsa-miR-132-3p bzw. hsa-miR-212-3p transfiziert (Methodenteil 3.3.7).



Die Selektion mittels Puromycin erfolgte 48-96 Stunden nach Transfektion der Zellen.

Auffällig war, dass insbesondere die mit dem Knock-down-Plasmid behandelten SH-SY5Y Zellen eine sehr niedrige Überlebensrate zeigten. Trotz mehrerer Transfektionen mit leicht verändertem Protokoll (Plasmid- und Lipofectaminmenge) konnten keine mit dem Knock-down Plasmid transfizierten SH-SY5Y Zellen generiert werden. Durch den über einige Wochen aufrechterhaltenen Selektionsdruck des Puromycins sollten nur tatsächlich mit den Plasmiden transient transfizierte Zellen in der Kultur überleben. Die transfizierten Zellen wurden nach Erreichen ausreichender Zelldichte geerntet, die Gesamt-RNA extrahiert und anschließend in einer semiquantitativen real time PCR auf die Expression der beiden miRNAs untersucht. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Abbildung (Abb. 25) dargestellt.

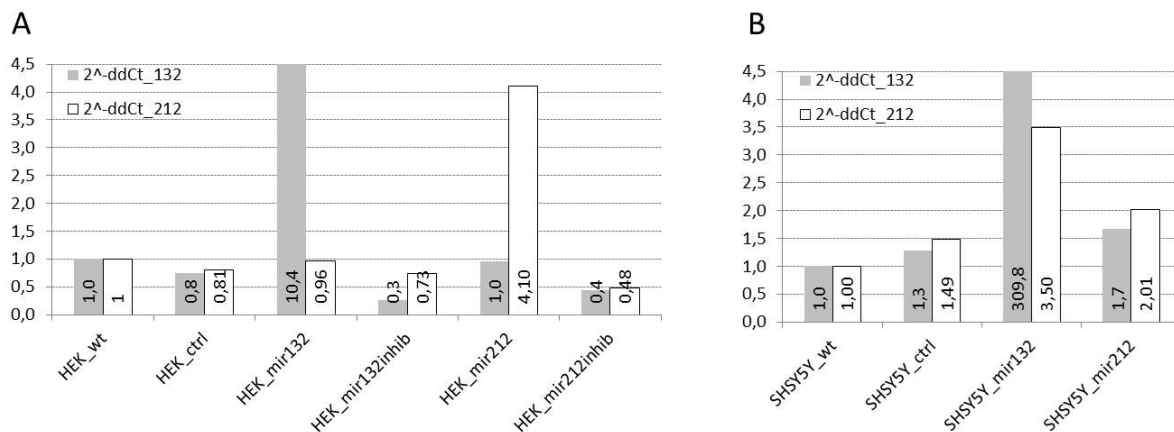


Abb. 25: Graphische Darstellung der miR-132/212 Expressionsänderung in HEK293T und SH-SY5Y Zellen nach Transfektion
 Expressionsänderung nach Transfektion von (A) HEK293T und (B) SH-SY5Y Zellen nach Transfektion mit Plasmiden zur Überexpression oder Knock-Down von miR-132 bzw. miR-212

Der Fold Change (FC; $2^{-\Delta\Delta CT}$) beschreibt die auf die endogene Kontrolle normalisierte Expressionsrate der transfizierten Zell-Linie als Vielfaches der normalisierten Expressionsraten des Wildtyps dieser Zell-Linie.

Aufgrund der exponentiellen Berechnung gilt hierbei für die Regulation:

- Keine Regulation für $0,5 < FC < 2$
- Hochregulation für $FC > 2$
- Herunterregulation für $FC < 0,5$

Die Transfektion beider Zell-Linien mit einem Kontrollplasmid zeigt keine Auswirkung auf die Expression der beiden miRNAs. In den HEK293T Zellen ist nach Transfektion mit den precursor-kodierenden Plasmiden eine Überexpression der jeweiligen miRNA zu beobachten. Es zeigt sich eine 10fach höhere Expression der miR-132 und eine 4fach höhere Expression der miR-212 in den transfizierten HEK293T Zellen im Vergleich zu den Wildtyp Zellen. Die Expression der Antisense-Sequenz führt hingegen nur zu einer minimalen Herunterregulation.

Die Transfektion der SH-SY5Y Zellen mit den precursor-kodierenden Plasmiden zeigt lediglich für miR-132 eine deutliche Überexpression, wobei hier auch eine Hochregulation der miR-212 zu verzeichnen ist. Die Transfektion mit dem für den miR-212 Precursor kodierenden Plasmid führt nicht zu einer Überexpression von miR-212. Die Transfektion mit Antisense-Sequenz kodieren Plasmiden war bislang nicht erfolgreich.



Entscheidend für die Deregulation der miRNAs durch die transfizierten Plasmide ist die Transfektionseffizienz. Um diese zu überprüfen wurden die transfizierten Zellen parallel im Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Dabei tragen die Plasmide die eine Inhibitor-Sequenz kodieren eine Sequenz für mCherry (rotfluoreszierend) und Plasmide die eine miR-Precursor-Sequenz kodieren eine Sequenz für eGFP (grünfluoreszierend).

Unter dem Fluoreszenzmikroskop waren jeweils unterschiedlich starke Fluoreszenzsignale zu beobachten. Nur einige wenige Zellen zeigten ein deutliches Fluoreszenzsignal (Daten nicht gezeigt). Diese niedrige Transfektionseffizienz von maximal 5% konnte trotz mehrfacher Wiederholung der Experimente mit leicht abgewandelten Protokollen nicht verbessert werden.



5. DISKUSSION

5.1. miRNome in Morbus Alzheimer

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in einem genomweiten Ansatz auf der Basis der Mikroarray-Technologie die Expression in 64 temporalen Kortizes von Alzheimer Patienten und gesunden Kontrollen analysiert. Von insgesamt mehr als 1200 in miRBase (Version 16) annotierten humanen microRNAs konnte für etwa die Hälfte von ihnen informative Signalintensitäten ermittelt werden. Von diesen wurden 102 in beide Richtungen gleichermaßen deregulierte miRNAs detektiert. Obwohl inzwischen bereits eine Vielzahl an microRNA Studien publiziert wurde, zeigt sich nur eine begrenzte Übereinstimmung der Ergebnisse. Etwa 25% der deregulierten 102 miRNAs wurden bereits in einer oder mehr Publikation mit Alzheimer in Verbindung gebracht (Lau et al., 2014; Satoh, 2012). Bei der Hälfte der bereits beschriebenen miRNAs stimmte die Regulationsrichtung mit den Angaben der Literatur überein. Die Schnittmenge erscheint zunächst klein, muss aber unter anderen Gesichtspunkten bewertet werden. Eine der wichtigsten Ursachen für die überschaubare Schnittmenge bzgl. der identifizierten miRNAs zwischen den einzelnen Studien ist sicherlich die zur Analyse angewandte Methode. Während die RNA-Sequenzierung ein sehr exaktes Abbild aller in den analysierten Proben vorhandenen miRNAs liefern kann, ist die Analyse mittels Mikroarray auf die auf diesem hinterlegten Marker begrenzt. Dennoch bieten beide Ansätze die Möglichkeit eine genomweite Analyse durchzuführen. Mittels real time PCR ist theoretisch ein genomweiter Ansatz möglich, allerdings wird diese Methode im Allgemeinen eher zur Analyse ausgewählter miRNAs eingesetzt (Kandidaten getriebener Ansatz). Diese Annahme wird durch eine 2013 von Kolbert und Kollegen veröffentlichte Publikation unterstützt, in der sie verschiedene Plattformen und Techniken zur Analyse von miRNA Expressionen miteinander verglichen haben (Kolbert et al., 2013). Zwischen den untersuchten Methodenspektren beobachteten sie eine starke Variation von 35-70% der detektierten miRNA-Transkripte sowie deren Expressionsstärke. Neben den zur Analyse genutzten Methoden haben Probenanzahl und die für die Untersuchung ausgewählte Gehirnregion Einfluss auf die Ergebnisse von Expressionsanalysen. In der Regel stehen nur wenige humane Gehirngewebeproben zur Verfügung und häufig werden in den verschiedenen Studien unterschiedliche Gehirnregionen (z.B. Kortex, Hippocampus, graue/weiße Substanz) verwendet, die deutliche Unterschiede bzgl. der exprimierten miRNAs aufweisen können. Letzteres mag auch der Grund dafür sein, dass einige der sich mit der Literatur überschneidenden miRNAs in die entgegengesetzte Richtung dereguliert gefunden wurden. Erwähnenswert ist, dass sich unter den in die gleiche Richtung deregulierten miRNAs ein auf Chromosom 17 des humanen Genoms intergenisch kodierter miRNA-Cluster befindet. Dieses Cluster besteht aus hsa-miR-132-3p und hsa-miR-212-3p, zwei als gemeinsame Vorläufer-miRNA prozessierte miRNAs, deren reife in Vertebraten stark konservierte Sequenzen nahezu identisch sind (Abb. 26) (Wan et al., 2012).

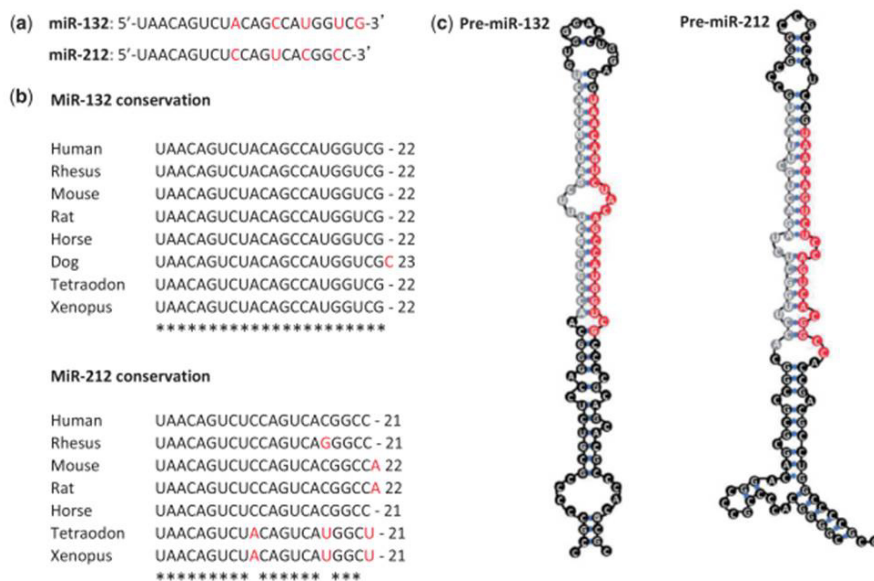


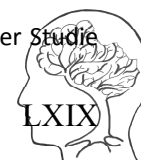
Abb. 26: Sequenzen des miR-132/212 Clusters

Die Abbildung wurde der Publikation Wanet et al 2012 entnommen. (a) zeigt die reifen nahezu identischen miRNA Sequenzen; (b) stellt die konservierten Sequenzen in anderen Vertebraten dar und (c) zeigt vorhergesagte pre-miR-Stammschlaufenstruktur

Hsa-miR-132-3p und hsa-miR-212-3p erreichten als einzige der 102 deregulierten miRNAs, genomweite Signifikanz. Auffällig war, dass hsa-miR-132-3p einerseits in temporalen Kortex von Alzheimer Patienten stärker herunterreguliert und andererseits in denen der Kontrollen stärker exprimiert war als hsa-miR-212-3p. Dieses Ergebnis deckt sich mit Informationen aus der Literatur, wonach hsa-miR-132-3p die stärker exprimierte miRNA des Clusters ist, obwohl beide von einem gemeinsamen Transkript prozessiert werden. Eine Erklärung könnte eine abweichende post-transkriptionelle Regulation beider miRNAs sein (Magill et al., 2010; Wanet et al., 2012).

Die Herunterregulation des miR-132/212 Clusters in AD konnte erfolgreich in einer semiquantitativen real time PCR im (i) temporalen und (ii) präfrontalen Kortex der gleichen Individuen, sowie in (iii) präfrontalen Kortex eines unabhängigen großen Probensets der niederländischen Gehirnbank (NBB) validiert werden. Hierbei ist zu erwähnen, dass sich ein Teil der Proben der NBB Kohorte mit den in der Studie von Lau und Kollegen verwendeten Proben überschneidet, bei welchen ebenfalls die Herunterregulation von miR-132 beschrieben wurde. Im Vergleich zu der hier vorliegenden Studie nutzten Lau *et al.* die Nano String Technologie zur Expressionsanalyse von 641 miRNAs in grauer Substanz des Hippocampus und präfrontalen Kortex von ~ 100 AD und Kontrollproben (Lau et al., 2013).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation beider miRNAs des miR-132/212 Clusters in den temporalen Kortex der MUC Kohorte bereits zu einem recht frühen Stadium der Erkrankung ab Braak Stadium II einsetzt und das Expressionslevel mit fortschreitender Erkrankung weiter abnimmt. Sinkende Expressionslevel bergen die Gefahr, durch die für Alzheimer charakteristische Neurodegeneration bedingt und damit artifiziell zustande gekommen zu sein. Um den zellulären Ursprung der Herunterregulation näher zu untersuchen, wurden graue und weiße Substanz von Alzheimer Patientinnen separat voneinander untersucht. Die Deregulation beider miRNAs war in der grauen Substanz stärker zu beobachten, was auf einen eher neuronalen Charakter der deregulierten miRNAs hinweist. Diese Annahme wird durch Ergebnisse einer Studie



von Lau und Kollegen weiter bestärkt. Sie konnten vor kurzem eine deutliche Abnahme der miR-132 Expression insbesondere in tangle-haltigen Neuronen des Kortex von AD Patienten nachweisen (Lau et al., 2013). Im Gegensatz dazu detektierten Wang und Kollegen für miR-212 eine stärkere Herunterregulation in der weißen Substanz (Wang et al., 2011), was jedoch der geringen Anzahl untersuchter Proben (N=10) und der Stratifizierung nach Geschlecht geschuldet sein dürfte. Vergleicht man diesen Trend über die Braak Stadien mit dem anderen neuronal exprimierten miRNAs so tritt der Expressionsverlust für das miR-132/212 Cluster bereits sehr viel früher und stärker ein. Dies spricht gegen die Möglichkeit, dass der mit dem Verlauf der Erkrankung auftretende Verlust von Nervenzellen die Hauptursache für die detektierte Abnahme der miR-132/212 Expression ist. Eine entsprechend analoge Analyse wurde von Lau und Kollegen im präfrontalen Kortex durchgeführt. Auch hier geht man davon aus dass das sinkende Expressionslevel weniger ein sekundärer Effekt des neuronalen Verlustes, sondern eher eine ausschlaggebende Konsequenz der Erkrankung ist (Lau et al., 2013).

5.2. miR-132/212 in AD

Seit Beginn der hier präsentierten Arbeiten wurde die Herunterregulation beider miRNAs (miR132/212) für verschiedene Gehirnregionen von Alzheimer Patienten sowie in Alzheimer Zell- und Mausmodellen in verschiedenen Studien gezeigt (Cogswell et al., 2008; Hansen et al., 2016; Hébert, Wang, Zhu, & Nelson, 2013; Lau et al., 2013; Wang et al., 2011; Wong et al., 2013). Neben der von Lau *et al* in tangle-haltigen kortikalen Neuronen detektierten verringerten Expression von miR-132 gibt es weitere Studien, die auf einen Einfluss der miR-132 Expression auf die Prozessierung von MAPT hinweisen. Der Expressionsverlust führt bei frontotemporaler Demenz und progressiver supranukleärer Blickparese zu alternativem Splicing von Exon10 in Tau durch PTBP2 (Hébert, Sergeant, & Buée, 2012; Lau et al., 2014; Smith et al., 2011). Erst kürzlich wurde die Herunterregulation von miR-132 in AD nicht nur mit Tau- sondern auch mit der Amyloid-Pathologie in Verbindung gebracht (Salta, Sierksma, Vanden Eynden, & De Strooper, 2016).

Des Weiteren wurde miR-132 auch eine Beteiligung an anderen mit der Alzheimerpathogenese assoziierten Stoffwechselwegen zu geschrieben, wie beispielsweise inflammatorischen Prozessen (Soreq & Wolf, 2011), synaptischen Funktionen, - Strukturen und -Plastizität (Bicker, Lackinger, Weiß, & Schratt, 2014; Edbauer et al., 2010; Remenyi et al., 2013a), sowie cholinergen Signalwegen (Lu, Zhang, Zhang, Wu, & Zhang, 2013; Shaked et al., 2009; Shaltiel et al., 2013). Beide miRNAs sind auch bei der neuronalen Migration, dem Wachstum von Axonen und der Ausbildung einer neuronalen Morphologie beteiligt (Hancock, Preitner, Quan, & Flanagan, 2014; Hansen, Sakamoto, Wayman, Impey, & Obrietan, 2010; Magill et al., 2010). Außerdem wurde die verminderte miR-132 Expression bereits von Wong und Kollegen mit der Induktion der Apoptose mittels Derepression von FOXO3a assoziiert (Wong et al., 2013).

Unter dem Aspekt, dass diese miRNA an derart vielen verschiedenen mit AD relevanten Stoffwechselwegen beteiligt zu sein scheint, unterstreicht den potentiellen Einfluss der identifizierten Herunterregulation auf die Pathogenese der Erkrankung.



5.3. Deregulierte mRNAs in Morbus Alzheimer

Parallel zum initialen miRNA Screen wurde in den gleichen Proben mittels Illumina BeadArray-Technologie ein genomweites mRNA Profil erstellt. Etwa 25% der 47000 Illumina Marker des Arrays konnten erfolgreich in den temporalen Kortex von AD Patienten und gesunden Kontrollen identifiziert werden. Für 3544 der informativen Marker konnte eine veränderte Expression in AD detektiert werden, darunter 10 Marker mit genomweiter Signifikanz. Unter den am stärksten deregulierten mRNAs befand sich eine beachtliche Anzahl von Genen, die zuvor bereits mit Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht oder als Teil Alzheimer relevanter Stoffwechselwege beschrieben wurden.

RNU1-3, RNU1-5 und RNU1G2, drei kleine nukleäre RNAs, die Teil des zellulären Spleißosomenkomplexes sind, waren in AD signifikant höher exprimiert. Erst kürzlich fand man heraus, dass die entsprechenden Proteine in der Lage sind tangle-ähnliche Strukturen zu bilden, mit NFTs zu aggregieren und zudem einen starken Einfluss auf den Spleißprozess in AD haben (Bai et al., 2013; Hales et al., 2014). Ebenfalls stark hochreguliert waren GFAP und NFKB1, zwei bekannte Marker für entzündliche Prozesse in Alzheimer (Ascolani et al., 2012; Huang, Liu, Grundke-Iqbal, Iqbal, & Gong, 2005; Ingelsson et al., 2004; Nagele et al., 2004). Hol und Kollegen konnten in Neuronen von Hippocampus mit AD Pathologie die Expression einer GFAP Spleißvariante nachweisen (Hol et al., 2003). Rao und Kollegen konnten 2012 zum einen eine Hypomethylierung von CpGs im Promotorbereich von NFKB und zum anderen eine erhöhte Expression der NFKB Untereinheiten p50 (= NFKB1) und p65 im frontalen Kortex von AD Proben nachweisen (Rao, Keleshian, Klein, & Rapoport, 2012). Der NFKB-Proteinkomplex kann durch TNF α , NGF, erhöhten intrazellulären Ca²⁺ Gehalt, Stress und A β aktiviert werden. Aktives NFKB wird in den Kern transloziert, bindet dort an die DNA und kann so die Expression weiterer Gene regulieren. HBP1 ist ein transkriptioneller Repressor, der in kortikalen Neuronen von Ratten mit A β 42 kolokalisiert gefunden wurde und mit A β -Clearance bzw. A β -Toxizität in Verbindung gebracht wurde (Takata et al., 2004). AEBP1, ebenfalls ein transkriptioneller Repressor, ist an der Immunantwort und der Cholesterinhomöostase beteiligt (Majdalawieh & Ro, 2010). Bei PKN2 handelt es sich um eine Proteinkinase, die beispielsweise das Neuriten-Wachstum von Neuronen im Hippocampus unterstützt (Buchser, Slepak, Gutierrez-Arenas, Bixby, & Lemmon, 2010). C5ORF41 (CREBRF) ist für die Regulation von CREB3 verantwortlich, welches seinerseits bei zellulärem Stress am Abbau fehlgefalteter Proteine beteiligt ist (Audas, Li, Liang, & Lu, 2008). TSPAN7, das einzige genomweit signifikante Gen, dessen Expression in AD niedriger ist als in den gesunden Kontrollen, ist auch das einzige gonosomale Gen. Es kodiert ein Zelloberflächenprotein und ist an Zellwachstum, der Ausbildung und Stabilität von Neuriten, sowie der Signalübertragung an Synapsen beteiligt (Bassani et al., 2012).

Gleicht man die in der vorliegenden Arbeit identifizierten deregulierten mRNAs mit Daten zweier kürzlich publizierter größerer Gen-Expressionsstudien (Chandrasekaran & Bonchev, 2016; Puthiyedth et al., 2016) ab, ergibt sich insbesondere beim Vergleich mit den Daten aus dem mittleren temporalen Gyrus (MTG) von Puthiyedth und Kollegen, eine relativ große Schnittmenge deregulierter Gene. Nahezu ein Drittel aller in der vorliegenden Arbeit identifizierten deregulierten Gene wurden auch in der Studie von Puthiyedth detektiert, darunter auch drei der genomweit signifikanten Gene: AEBP1, TSPAN7 und GFAP.



5.4. Korrelation zwischen miRNAs und mRNAs – validierte und vorhergesagte Zielgene

Bislang wurde nur eine Studie mit parallel durchgeführter Analyse genomweiter miRNA und mRNA Expression in Kortizes des Parietallappens von 10 AD- und Kontrollproben veröffentlicht (Nunez-Iglesias et al., 2010). Die vorliegende Arbeit ist daher mit für mehr als 60 humanen temporalen Kortizes simultan genomweit durchgeführte microRNA und mRNA Expressionsanalyse, die größte bisher publizierte Studie.

Nur etwa 1-2% des humanen Genoms kodiert für miRNAs. Jedoch reicht diese Anzahl an miRNAs aus um etwa 50 % der zahlreichen Gene auf post-transkriptioneller Ebene zu regulieren. Die Regulation erfolgt dabei durch Bindung der miRNA an komplementäre Sequenzen. Bislang sind nur einige wenige validierte Zielgene von miR-132 und miR-212 in der Literatur beschrieben (Lau et al., 2014; Wanet et al., 2012) 40% der von Lau et al und Wanet et al zusammengetragenen validierten Zielgene wie beispielsweise SIRT1, FOXO1 und p250GAP finden sich auch unter den in der vorliegenden Arbeit in Alzheimer identifizierten deregulierten Transkripten.

Die Korrelation genomweit signifikant deregulierter miRNAs mit genomweit signifikant deregulierten mRNAs führte in beiden Fällen zu nominal signifikanten p-Werten. Daher wurden die mRNA dieser Gene zusätzlich auf mögliche miR-132/212 Bindestellen in der 3' untranslatierten Region untersucht. In vier der zehn genomweit signifikant veränderten Transkripten konnte der von miWalk verwendete Algorithmus erfolgreich Bindestellen vorhersagen. Von den mit dem miR-132/212 Cluster korrelierenden Genen, erreichten nur NFKB1 und GFAP einen p-Wert der einer Bonferroni Korrektur für multiples Testen standhalten würde. Zudem zeigen GFAP und NFKB1 erhöhte Expressionslevel in AD, wohingegen die Expressionslevel der beiden miRNAs in AD erniedrigt waren. Diese antikorrelierten Expressionslevels von GFAP und NFKB1 mit miR-132/212, sowie die für die beiden mRNAs vorhergesagten miRNA Bindestellen und die energetisch günstigen miRNA-mRNA Strukturen führen zu der Annahme, dass es sich hier um tatsächliche Zielgene von miR-132/212 handeln könnte. Zusammen genommen, führen die signifikanten p-Werte der Korrelation von GFAP und NFKB1 mit den beiden miRNAs sowie die positiven *in silico* Analysen zu der Annahme, dass es sich hier tatsächlich um eine mögliche Interaktion zwischen den deregulierten reifen miRNAs und dem entsprechenden Transkript handeln könnte.

Dass eine solche Assoziation gerade zwischen eher in Gliazellen relevanten, inflammatorischen Genen (Ingelsson et al., 2004; Lian et al., 2014) und eher neuronal exprimierten microRNAs auftritt, erscheint zunächst überraschend. Jedoch muss erwähnt werden, dass für miR-132/212 auch in der weißen Substanz, welche überwiegend aus Gliazellen besteht, eine Herunterregulation zu beobachten war. Des Weiteren ist zu beachten, dass die beiden hier für die lineare Regression verwendeten Expressionsdaten in Gesamt-Gehirngewebe erhoben wurden. Der Literatur zufolge enthält ein 1,5 kg schweres Gehirn insgesamt je ~85 Mrd Glia und ebenso viele Neurone (Verhältnis 1:1) (Azevedo et al., 2009). Die Expressionslevel können daher also als Kombination aus neuronaler und gliärer Expression verstanden werden. Dieser Umstand könnte eine mögliche Ursache für die Assoziation der beiden miRNAs mit GFAP und NFKB1 sein.

Die wohl bekannteste Funktion von NFKB ist seine Rolle bei Inflamationsprozessen in Gliazellen, seit kurzem wird jedoch der homo- bzw. heterodimere Proteinkomplex (Kombination aus 5 verschiedenen Untereinheiten) auch mit synaptischer Plastizität, Lernen und Gedächtnis in Verbindung gebracht (Snow & Albensi, 2016). 1996 konnten Terai und Kollegen histochemisch belegen, dass NFKB, verglichen mit Gliazellen und gesunden



nichtpathologischen Gewebeproben, besonders stark in von der Alzheimerpathologie betroffenen Neuronen exprimiert wird (Terai, Matsuo, & McGeer, 1996). Dabei stellt NFKB1 (p50) die zusammen mit p65 in Neuronen am häufigsten vorkommende Untereinheit des NFKB-Proteinkomplexes dar. De la Rica und Kollegen konnten 2015 erstmals einen direkten Einfluss von NFKB auf das miR-132/212 Cluster bei der Differenzierung von Osteoclasten nachweisen (de la Rica et al., 2015). Diese Beobachtung unterstützt, die in der Arbeit postulierte Hypothese aus den Ergebnissen von mRNA-miRNA Korrelation und vorhergesagten Zielsequenzen, dass NFKB1 mit dem miR-132/212 Cluster interagiert und könnte somit eine wichtige Rolle für die Pathogenese von Morbus Alzheimer spielen.

Der zelluläre Kontext in dem eine miRNA exprimiert wird, hat entscheidenden Einfluss auf die Regulation der entsprechenden Zielgene (Nam et al., 2014). Beispielsweise können Transkripte des gleichen Gens in zwei verschiedenen Zelltypen Unterschiede bzgl des 3'UTR Bereichs oder der Polyadenylierung aufweisen oder schlicht als unterschiedliche Isoformen vorkommen (Nam et al., 2014).

Somit ist es denkbar dass eine durch eine miRNA vermittelte Regulation des gleichen Zielgens in Gliazellen und Neuronen einen jeweils anderen Effekt hervorrufen kann.

Hol et al. konnten beispielsweise im Zusammenhang mit GFAP zeigen, dass eine bestimmte Spleißvariante von GFAP, dessen Wildtyp-Variante üblicherweise als Gliamarker genutzt wird, ausschließlich in hippocampalen Neuronen mit AD Pathologie exprimiert wird. Die von Hol und Kollegen identifizierten GFAP Frameshift Mutationen, führen zu veränderte Spleißprodukten und damit zur Entstehung abnormer GFAP-Proteine. Ihnen fiel zudem auf, dass Neurone die diese abnormen GFAP Proteinen bilden, auch andere abnorme Proteine anreichern (Hol et al., 2003). Der Grund hierfür könnte eine bereits im Zusammenhang mit AD beschriebene defekte oder in ihrer Aktivität eingeschränkte proteosomalen Degradationsmaschinerie sein (de Vrij, Fischer, van Leeuwen, & Hol, 2004; Keller, Hanni, & Markesbery, 2001).

Interessanterweise findet sich unter den in der vorliegenden Arbeit signifikant deregulierten Genen, welche zudem mit miR-132/212 korrelieren und vorhergesagte Bindestellen aufweisen auch C5ORF41.

C5ORF41 degradiert CREB3, ein Gen das beispielsweise bei der Zellantwort auf fehlerhaft gefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum beteiligt ist (kurz: UPR = unfolded protein response), aber auch Funktionen bei viralen Infektionen und der Immunantwort innehat (Audas et al., 2008; Yang et al., 2013). Zu erwähnen ist, dass ein weiteres Mitglied der CREB-Familie die Transkription des miR-132/212 Clusters reguliert (Wanet et al., 2012). Eine verminderte Expression von CREB führt ähnlich wie der Verlust von miR-132/212 zu einem verminderten Wachstum der Dendriten, weniger verzweigten Neuronen und gestörter Gedächtnisbildung (Hernandez-Rapp et al., 2015; Magill et al., 2010).

Bei den hier präsentierten Daten handelt es sich um einen der größten, auf genomweiter Ebene, simultan für microRNA und mRNA in temporalen Kortizes von AD und Kontrollproben generierten Expressionsdatensätze. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zum einen viele der in früheren Studien bereits als dereguliert identifizierte und über zelluläre oder klinische Veränderungen mit Morbus Alzheimer in Verbindung gebrachten miRNAs und mRNAs bestätigt werden konnten, zum anderen aber auch bislang noch nicht mit AD assoziierte genomweit signifikant deregulierte Transkripte identifiziert werden konnten. Zudem weisen insbesondere die Ergebnisse für hsa-miR-132-3p und hsa-miR-212-3p auf einen bereits früh einsetzenden und weitreichenden



Einfluss des miR-132/212 Clusters auf die Pathogenese von Morbus Alzheimer hin. Durch die simultane Analyse von miRNA und mRNA konnten erfolgreich bislang nicht in Morbus Alzheimer in Erscheinung getretene potentielle Zielgene des miR-132/212 Clusters identifiziert werden.

Zur weiteren Validierung der Beobachtungen wurde versucht, in einem beschriebenen Mausmodell anhand unterschiedlich alter Tiere einen Zeitverlauf der Expression der miRNAs sowie deren Zielgene zu erheben. Das triple-transgene Mausmodell wurde ausgewählt, da die Mäuse neben Amyloid-Plaques auch die typische Tau-Pathologie, sowie neuronalen Zellverlust und kognitive Beeinträchtigungen entwickeln. In den Gehirngeweben der Tiere konnte jedoch leider keine signifikante Reduktion der Expression beider miRNAs gezeigt werden.

Jedoch ist es nicht ungewöhnlich, da sich Beobachtungen aus humanem Gewebe häufig nicht auf Mausmodelle übertragen lassen.

Um die zellulären und biologischen Konsequenzen der Herunterregulation des miR-132/212 Clusters zu verstehen, können funktionelle Studien in Zellkulturmodellen helfen. Daher wurde versucht, durch Transfektion von geeigneten Plasmiden die Expression der beiden microRNAs zu modulieren.

Die Transfektionseffizienz der HEK293T und der Neuroblastoma-Zell-Linie mit miR-132/212 bzw. antisense-Sequenzen kodierenden Plasmiden war dabei so gering, dass auf weitere Analysen der Zellpopulationen verzichtet wurde. Idealerweise sollten die Transfektionen in einem anderen neuronalen Zellmodell mit anderer Technologie wiederholt werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Genomweite Analyse zur Identifizierung differentiell exprimierter miRNAs und mRNAs in Morbus Alzheimer

MicroRNAs sind kleine nicht-kodierende RNA Moleküle, die mittels post-transkriptioneller Regulationsmechanismen an vielen verschiedenen biologischen und zellulären Prozessen beteiligt sind. Kürzlich wurde für einige miRNAs eine Deregulation in AD aufgezeigt, die eine völlig neue Sichtweise auf pathogene Mechanismen der Erkrankung bietet. Allerdings, wurden in den meisten miRNA Studien in AD lediglich einzelne miRNAs untersucht (hypothesengetriebene Ansätze), nur eine begrenzte Anzahl an Proben untersucht oder eine unabhängige Replikation vernachlässigt.

Das Ziel der vorliegenden Studie war eine simultane Untersuchung genomweiter miRNA und mRNA Expressionsmuster in kortikalen Gehirngeweben von AD Patienten und gesunden Kontrollen.

Die genomweite microRNA Expressionsanalyse wurde für mehr als 1200 annotierte humane miRNAs mittels Microarray Technologie in zwei unterschiedlichen Gehirnregionen von mehr als 60 Alzheimer Proben und unauffälligen Kontrollen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung von real time PCR erfolgreich in einer unabhängigen Kohorte von mehr als 300 humanen Gehirngewebeproben repliziert. Dabei wurden zwei miRNAs identifiziert, die im temporalen und präfrontalen Kortex von AD betroffenen Gehirngewebeproben signifikant reduziert vorliegen. Diese Reduktion beginnt bereits in frühen Braak Stadien und verstärkt sich im Verlauf der Erkrankung. Obwohl die Abnahme der Expressionslevel für beide miRNAs in grauer und weißer Substanz detektiert wurde, war eine stärkere Herunterregulation in der grauen Substanz zu beobachten, was für eine Herunterregulation eher neuronalen Ursprungs spricht.

Des Weiteren wurde eine genomweite mRNA Expressionsanalyse in den gleichen humanen Proben durchgeführt, bei der erhöhte Expressionslevels für kleine nukleäre RNAs, die Teil des Spleißosomenkomplexes sind, sowie für an Entzündungsprozessen beteiligte Marker wie GFAP und NFkB1 in AD identifiziert.

Durch Korrelationsanalyse konnten mRNA's identifiziert werden deren Expression direkt mit der Expression der beiden miRNA korrelieren. Interessanterweise zeigten alle genomweit signifikant mit miRNA korrelierten Gene mit Ausnahme von TSPAN7 eine Hochregulation in AD, während das miR-132/212 Cluster in AD herunterreguliert war, was für einen direkten Einfluss der miRNAs auf die mRNA dieser Gene spricht.

Dieser miRNome-weite Ansatz bestätigt die Ergebnisse vorheriger Studien und zeigt deutlich, dass die Herunterregulation von miR-132/212 ein früher und konsistenter Marker der Alzheimer'schen Erkrankung ist. Neben einer möglichen, wichtigen Rolle an Prozessen die für die Entstehung der Alzheimer Pathologie verantwortlich sind, tragen die MiR132 Familienmitglieder durchaus Potenzial als Biomarker. Auch für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze könnten die hier beschriebenen Ergebnisse neue Impulse setzen.



7. SUMMARY

Genome-wide analysis to identify differentially expressed miRNAs and mRNAs in Alzheimer's disease

MicroRNAs are small noncoding RNA molecules that are involved in multiple biological and cellular processes by post-transcriptional regulation of gene expression. Recently dysregulation of some miRNAs has been shown in Alzheimer's disease (AD) which offers a completely new view of potential pathogenic mechanisms leading to AD. However, most miRNA studies in AD so far analyzed only very few miRNAs (hypothesis-driven candidate approaches) and suffered from limited sample sizes and/or lack of independent replications.

The study aimed at simultaneous investigation of genome wide miRNA and mRNA expression patterns of cortical brain tissue in AD patients and healthy controls.

Genome wide miRNA expression screen for more than 1200 annotated human miRNAs was performed in two different brain regions of more than 60 AD and unaffected controls using microarray technology. The findings were successfully replicated in an independent collection of more than 300 human brain samples by the use of real time PCR. Thereby a genome wide significant downregulation of hsa-miR-132-3p and hsa-miR-212-3p was observed in the temporal and prefrontal cortex of AD brains, which is already detectable at early Braak stages and advancing during disease progression. Although the decline of both miRNAs was detectable in grey and white matter sections, a considerable stronger downregulation was observed in the grey matter which supports the primarily neuronal origin of the downregulation.

In addition, a genome wide mRNA expression analysis was performed using the same brain samples. Several differentially expressed genes were identified, of which increased levels of small nuclear RNAs that are part of spliceosome complex as well as markers of inflammation in AD were most prominent. Correlation of expression levels of the two candidate miRNA.

Interestingly, all of the genome wide significant correlated genes (except TSPAN7) were upregulated in AD whereas the miR-132/212 cluster was downregulated in AD suggesting that both miRNAs might regulate the mRNAs of those genes in a direct manner.

This miRNome-wide approach adds substantial evidence to previous studies and clearly shows that miR-132/212 down-regulation is an early occurring and consistent event in AD contributing to the pathogenesis of AD.

Assessment of both genome wide data sets, and performing an *in silico* analysis of potential target binding sites, resulted in novel prospective candidate targets for miR-132/212 supporting a strong association of both miRNAs with important pathways affected in AD, such as inflammation, cell survival and lipid metabolism.

Taken together, this miRNome-wide approach adds substantial evidence to previous studies and clearly shows that miR-132/212 down-regulation is an early and consistent event in AD. Besides their possibly important contribution to the pathogenesis of AD, miR-132 family members may also be useful as prospective non-invasive biomarkers or may open new opportunities for the development of therapeutic interventions.



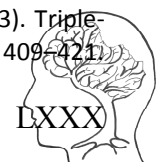
8. LITERATURVERZEICHNIS

- 2015 Alzheimer's disease facts and figures. (2015). *Alzheimer's & Dementia*, 11(3), 332–384. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2015.02.003>
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift Für Psychiatrie Und Psychisch-Gerichtliche Medizin*, 146–148.
- Ascolani, A., Balestrieri, E., Minutolo, A., Mosti, S., Spalletta, G., Bramanti, P., ... Macchi, B. (2012). Dysregulated NF- κ B pathway in peripheral mononuclear cells of Alzheimer's disease patients. *Current Alzheimer Research*, 9(1), 128–37. <http://doi.org/10.2174/156720512799015091>
- Audas, T. E., Li, Y., Liang, G., & Lu, R. (2008). A novel protein, Luman/CREB3 recruitment factor, inhibits Luman activation of the unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology*, 28(12), 3952–66. <http://doi.org/10.1128/MCB.01439-07>
- Azevedo, F. A. C., Carvalho, L. R. B., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E. L., Leite, R. E. P., ... Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 513(5), 532–41. <http://doi.org/10.1002/cne.21974>
- Bai, B., Hales, C. M., Chen, P., Gozal, Y., Dammer, E. B., & Fritz, J. J. (2013). U1 small nuclear ribonucleoprotein complex and RNA splicing alterations in Alzheimer's disease. <http://doi.org/10.1073/pnas.1310249110/-DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1310249110>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>
- Bassani, S., Cingolani, L. A., Valnegri, P., Folci, A., Zapata, J., Gianfelice, A., ... Passafaro, M. (2012). The X-linked intellectual disability protein TSPAN7 regulates excitatory synapse development and AMPAR trafficking. *Neuron*, 73(6), 1143–58. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.021>
- Beier, V., & Hoheisel, J. (2008). MicroRNAs Small Molecules with Big Impact in Cancer. *BIOforum Europe*.
- Bickel, H. (2009). Die Epidemiologie der Demenz (pp. 1–5).
- Bicker, S., Lackinger, M., Weiß, K., & Schratt, G. (2014). MicroRNA-132, -134, and -138: a microRNA troika rules in neuronal dendrites. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1671-7>
- Bodendorf, U., Danner, S., Fischer, F., Stefani, M., Sturchler-Pierrat, C., Wiederhold, K.-H., ... Paganetti, P. (2002). Expression of human beta-secretase in the mouse brain increases the steady-state level of beta-amyloid. *Journal of Neurochemistry*, 80(5), 799–806. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11948243>
- Boudreau, R. L., Jiang, P., Gilmore, B. L., Spengler, R. M., Tirabassi, R., Nelson, J. A., ... Davidson, B. L. (2014). Transcriptome-wide discovery of microRNA binding sites in human brain. *Neuron*, 81(2), 294–305. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.062>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4), 239–259. <http://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Buchser, W. J., Slepak, T. I., Gutierrez-Arenas, O., Bixby, J. L., & Lemmon, V. P. (2010). Kinase/phosphatase overexpression reveals pathways regulating hippocampal neuron morphology. *Molecular Systems Biology*, 6, 391. <http://doi.org/10.1038/msb.2010.52>
- Chandrasekaran, S., & Bonchev, D. (2016). Network Topology Analysis of Post-Mortem Brain Microarrays Identifies More Alzheimer's Related Genes and MicroRNAs and Points to Novel Routes for Fighting with the Disease. *PLoS One*, 11(1), e0144052. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0144052>
- Clarfield, A. M. (2003). The decreasing prevalence of reversible dementias: an updated meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, 163(18), 2219–29. <http://doi.org/10.1001/archinte.163.18.2219>
- Cogswell, J. P., Ward, J., Taylor, I. A., Waters, M., Shi, Y., Cannon, B., ... Richards, C. A. (2008). Identification of miRNA changes in Alzheimer's disease brain and CSF yields putative biomarkers and insights into disease pathways. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 14(1), 27–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18525125>
- Colangelo, V., Schurr, J., Ball, M. J., Pelaez, R. P., Bazan, N. G., & Lukiw, W. J. (2002). Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: transcription and neurotrophic factor down-regulation and up-regulation of apoptotic and pro-inflammatory signaling. *Journal of Neuroscience Research*, 70(3), 462–73. <http://doi.org/10.1002/jnr.10351>
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Risch, N. J., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., ... Schmechel, K. E. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nature Genetics*, 7(2), 180–184. <http://doi.org/10.1038/ng0694-180>

- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., ... Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science (New York, N.Y.)*, 261(5123), 921–3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8346443>
- Cruts, M., Theuns, J., & Van Broeckhoven, C. (2012). Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Human Mutation*, 33(9), 1340–4. <http://doi.org/10.1002/humu.22117>
- Cullen, B. R. (2006). Viruses and microRNAs. *Nature Genetics*, 38(6s), S25–S30. <http://doi.org/10.1038/ng1793>
- Cuyvers, E., & Sleegers, K. (2016). Genetic variations underlying Alzheimer's disease: evidence from genome-wide association studies and beyond. *The Lancet Neurology*, 15(8), 857–868. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00127-7](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00127-7)
- de la Rica, L., García-Gómez, A., Comet, N. R., Rodríguez-Ubreva, J., Ciudad, L., Vento-Tormo, R., ... Ballestar, E. (2015). NF- κ B-direct activation of microRNAs with repressive effects on monocyte-specific genes is critical for osteoclast differentiation. *Genome Biology*, 16(1), 2. <http://doi.org/10.1186/s13059-014-0561-5>
- de Vrij, F. M. S., Fischer, D. F., van Leeuwen, F. W., & Hol, E. M. (2004). Protein quality control in Alzheimer's disease by the ubiquitin proteasome system. *Progress in Neurobiology*, 74(5), 249–270. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.10.001>
- Edbauer, D., Neilson, J. R., Foster, K. a, Wang, C.-F., Seeburg, D. P., Batterton, M. N., ... Sheng, M. (2010). Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, 65(3), 373–84. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.01.005>
- Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., & Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *The Journal of Cell Biology*, 160(1), 113–23. <http://doi.org/10.1083/jcb.200207113>
- Fischer, A. (2014). Epigenetic memory: the Lamarckian brain. *The EMBO Journal*. <http://doi.org/10.1002/embj.201387637>
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., & Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue), D140–4. <http://doi.org/10.1093/nar/gkj112>
- Hales, C. M., Dammer, E. B., Diner, I., Yi, H., Seyfried, N. T., Gearing, M., ... Lah, J. J. (2014). Aggregates of small nuclear ribonucleic acids (snRNAs) in Alzheimer's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*. <http://doi.org/10.1111/bpa.12133>
- Hancock, M. L., Preitner, N., Quan, J., & Flanagan, J. G. (2014). MicroRNA-132 Is Enriched in Developing Axons, Locally Regulates Rasa1 mRNA, and Promotes Axon Extension. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(1), 66–78. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3371-13.2014>
- Hansen, K. F., Sakamoto, K., Aten, S., Snider, K. H., Loeser, J., Hesse, A. M., ... Obrietan, K. (2016). Targeted deletion of miR-132/-212 impairs memory and alters the hippocampal transcriptome. *Learning & Memory*, 23(2), 61–71. <http://doi.org/10.1101/lm.039578.115>
- Hansen, K. F., Sakamoto, K., Wayman, G. A., Impey, S., & Obrietan, K. (2010). Transgenic miR132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory. *PloS One*, 5(11), e15497. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015497>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353–6. <http://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., ... Williams, J. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41(10), 1088–93. <http://doi.org/10.1038/ng.440>
- Hébert, S. S., Horr , K., Nicola , L., Papadopoulou, A. S., Mandemakers, W., Silah aroglu, A. N., ... De Strooper, B. (2008). Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), 6415–20. <http://doi.org/10.1073/pnas.0710263105>
- Hébert, S. S., Sergeant, N., & Bu e, L. (2012). MicroRNAs and the Regulation of Tau Metabolism. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 406561. <http://doi.org/10.1155/2012/406561>
- Hébert, S. S., Wang, W.-X., Zhu, Q., & Nelson, P. T. (2013). A study of small RNAs from cerebral neocortex of pathology-verified Alzheimer's disease, dementia with lewy bodies, hippocampal sclerosis, frontotemporal lobar dementia, and non-demented human controls. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 35(2), 335–48. <http://doi.org/10.3233/JAD-122350>
- Hernandez-Rapp, J., Smith, P. Y., Filali, M., Goupil, C., Planel, E., Magill, S. T., ... Hébert, S. S. (2015). Memory formation and retention are affected in adult miR-132/212 knockout mice. *Behavioural Brain Research*.

- 287, 15–26. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.032>
- Hol, E. M., Roelofs, R. F., Moraal, E., Sonnemans, M. A. F., Sluijs, J. A., Proper, E. A., ... van Leeuwen, F. W. (2003). Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. *Molecular Psychiatry*, 8(9), 786–796. <http://doi.org/10.1038/sj.mp.4001379>
- Hollingsworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J.-C., Carrasquillo, M. M., ... Williams, J. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 43(5), 429–35. <http://doi.org/10.1038/ng.803>
- Huang, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., & Gong, C.-X. (2005). NF-kappaB precursor, p105, and NF-kappaB inhibitor, Ikbppgamma, are both elevated in Alzheimer disease brain. *Neuroscience Letters*, 373(2), 115–8. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.09.074>
- Hubin, E., van Nuland, N. A. J., Broersen, K., & Pauwels, K. (2014). Transient dynamics of A β contribute to toxicity in Alzheimer's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. <http://doi.org/10.1007/s00018-014-1634-z>
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K. L., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., Frosch, M. P., ... Irizarry, M. C. (2004). Early A accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*, 62(6), 925–931. <http://doi.org/10.1212/01.WNL.0000115115.98960.37>
- Jellinger, K. (2005). Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS) – Eine aktuelle Übersicht. *Journal Für Neurologie Neurochirurgie Und Psychiatrie*, 6(1), 9–18.
- Jiang, T., Yu, J.-T., Tian, Y., & Tan, L. (2013). Epidemiology and Etiology of Alzheimer's Disease: from Genetic to Non-Genetic Factors. *Current Alzheimer Research*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23919770>
- Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2014). ApoE and A β in Alzheimer's disease: accidental encounters or partners? *Neuron*, 81(4), 740–54. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.045>
- Katzman, R. (1976). The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 33(4), 217. <http://doi.org/10.1001/archneur.1976.00500040001001>
- Keller, J. N., Hanni, K. B., & Markesbery, W. R. (2001). Impaired Proteasome Function in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 75(1), 436–439. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750436.x>
- Kim, J., Yoon, H., Ramírez, C. M., Lee, S.-M., Hoe, H.-S., Fernández-Hernando, C., & Kim, J. (2012). MiR-106b impairs cholesterol efflux and increases A β levels by repressing ABCA1 expression. *Experimental Neurology*, 235(2), 476–83. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.11.010>
- Klünemann, H. H., Fronhöfer, W., Wurster, H., Fischer, W., Ibach, B., & Klein, H. E. (2002). Alzheimer's second patient: Johann F. and his family. *Annals of Neurology*, 52(4), 520–3. <http://doi.org/10.1002/ana.10309>
- Kolbert, C. P., Feddersen, R. M., Rakhshan, F., Grill, D. E., Simon, G., Middha, S., ... Jen, J. (2013). Multi-Platform Analysis of MicroRNA Expression Measurements in RNA from Fresh Frozen and FFPE Tissues. *PLoS ONE*, 8(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0052517>
- Kraepelin, E. (1910). *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte* (II. Band). Leipzig: Verlag Johann Ambrosius Barth.
- Kurz, A. (2010). Neurodegenerative Krankheiten. In B. / K. A.-S. e. V. (Hrsg. . Schumpelick, Volker / Vogel (Ed.), *Innovationen in Medizin und Gesundheitswesen* (1. Auflage, pp. 329–338). Freiburg: Herder Verlag.
- Kurz, A. (2013). Das Wichtigste über die Alzheimer-Krankheit und andere Demenzformen. Retrieved February 2, 2014, from http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/broschueren/das_wichtigste_ueber_alzheimer_und_demenzen.pdf
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., & Tuschl, T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA (New York, N.Y.)*, 9(2), 175–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12554859>
- Lambert, J.-C., Ibrahim-Verbaas, C. a, Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., ... Amouyel, P. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*. <http://doi.org/10.1038/ng.2802>
- Lancôtôt, K. L., Rajaram, R. D., & Herrmann, N. (2009). Therapy for Alzheimer's Disease: How Effective are Current Treatments? *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 2(3), 163–80. <http://doi.org/10.1177/1756285609102724>
- Lau, P., Bossers, K., Janky, R., Salta, E., Frigerio, C. S., Barbash, S., ... De Strooper, B. (2013). Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Molecular Medicine*. <http://doi.org/10.1002/emmm.201201974>
- Lau, P., Frigerio, C. S., & De Strooper, B. (2014). Variance in the identification of microRNAs deregulated in Alzheimer's disease and possible role of lincRNAs in the pathology: the need of larger datasets. *Ageing Research Reviews*. <http://doi.org/10.1016/j.arr.2014.02.006>

- Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A. C.-A., Fowler, S. W., ... Zheng, H. (2014). NFκB-Activated Astroglial Release of Complement C3 Compromises Neuronal Morphology and Function Associated with Alzheimer's Disease. *Neuron*, 85(1), 101–115. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.11.018>
- Liu, W., Liu, C., Zhu, J., Shu, P., Yin, B., Gong, Y., ... Peng, X. (2012). MicroRNA-16 targets amyloid precursor protein to potentially modulate Alzheimer's-associated pathogenesis in SAMP8 mice. *Neurobiology of Aging*, 33(3), 522–34. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.04.034>
- Lord, J., Lu, A. J., & Cruchaga, C. (2014). Identification of rare variants in Alzheimer's disease. *Frontiers in Genetics*, 5, 369. <http://doi.org/10.3389/fgene.2014.00369>
- Lu, L., Zhang, X., Zhang, B., Wu, J., & Zhang, X. (2013). Synaptic acetylcholinesterase targeted by microRNA-212 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45(11), 2530–2540. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272513002616>
- Lukiw, W. J., Andreeva, T. V., Grigorenko, A. P., & Rogaev, E. I. (2012). Studying micro RNA Function and Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Genetics*, 3, 327. <http://doi.org/10.3389/fgene.2012.00327>
- Magill, S. T., Cambronne, X. A., Luikart, B. W., Lioy, D. T., Leighton, B. H., Westbrook, G. L., ... Goodman, R. H. (2010). microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(47), 20382–7. <http://doi.org/10.1073/pnas.1015691107>
- Majdalawieh, A., & Ro, H.-S. (2010). Regulation of IkappaBalpha function and NF-kappaB signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2010, 823821. <http://doi.org/10.1155/2010/823821>
- Majoros, W. H., & Ohler, U. (2007). Spatial preferences of microRNA targets in 3' untranslated regions. *BMC Genomics*, 8(1), 152. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-8-152>
- Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8), a006239-. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006239>
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34(7), 939–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6610841>
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Kawas, C. H., ... Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 7(3), 263–9. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- Mielke, M. M., Vemuri, P., & Rocca, W. A. (2014). Clinical epidemiology of Alzheimer's disease: assessing sex and gender differences. *Clinical Epidemiology*, 6, 37–48. <http://doi.org/10.2147/CLEP.S37929>
- Möller, H.-J., & Graeber, M. B. (1998). The case described by Alois Alzheimer in 1911. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 248(3), 111–122. <http://doi.org/10.1007/s004060050027>
- Mueller, O., Lightfoot, S., & Andreas Schroeder. (2016). RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control.
- Nagele, R. G., Wegiel, J., Venkataraman, V., Imaki, H., Wang, K.-C., & Wegiel, J. (2004). Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 25(5), 663–74. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.01.007>
- Naj, A. C., Jun, G., Beecham, G. W., Wang, L.-S., Vardarajan, B. N., Buross, J., ... Schellenberg, G. D. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 43(5), 436–41. <http://doi.org/10.1038/ng.801>
- Nam, J. W., Rissland, O. S., Koppstein, D., Abreu-Goodger, C., Jan, C., Agarwal, V., ... Bartel, D. P. (2014). Global analyses of the effect of different cellular contexts on microRNA targeting. *Molecular Cell*, 53(6), 1031–1043. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.013>
- Nelson, P. T., & Wang, W.-X. (2010). MiR-107 is reduced in Alzheimer's disease brain neocortex: validation study. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 21(1), 75–9. <http://doi.org/10.3233/JAD-2010-091603>
- Nunez-Iglesias, J., Liu, C.-C., Morgan, T. E., Finch, C. E., & Zhou, X. J. (2010). Joint genome-wide profiling of miRNA and mRNA expression in Alzheimer's disease cortex reveals altered miRNA regulation. *PLoS One*, 5(2), e8898. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0008898>
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., ... LaFerla, F. M. (2003). Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles. *Neuron*, 39(3), 409–421.



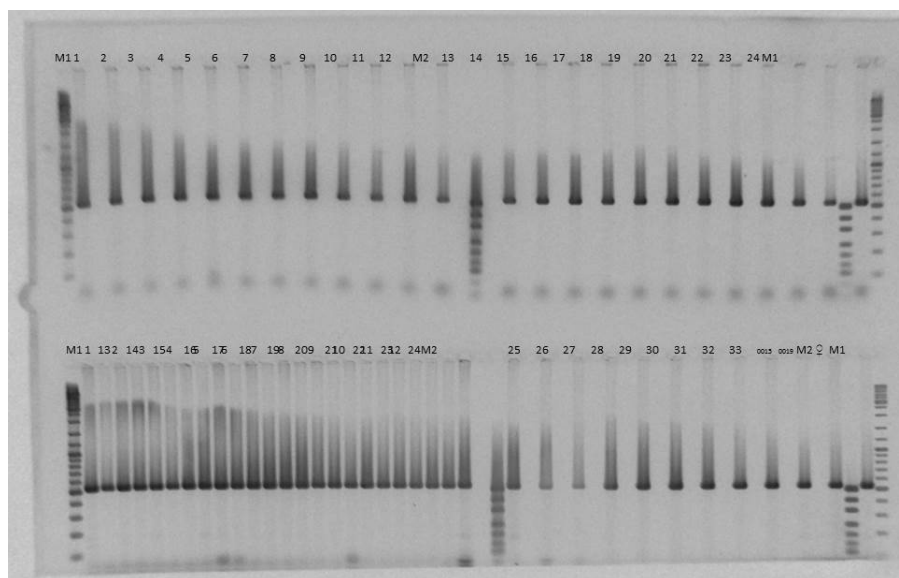
- [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- Pedersen, N. L., Gatz, M., Berg, S., & Johansson, B. (2004). How heritable is Alzheimer's disease late in life? Findings from Swedish twins. *Annals of Neurology*, 55(2), 180–185. <http://doi.org/10.1002/ana.10999>
- Poirier, J., Miron, J., Picard, C., Gormley, P., Thérout, L., Breitner, J., & Dea, D. (2014). Apolipoprotein E and Lipid Homeostasis in the Etiology and Treatment of Sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 35, S3–S10. <http://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.037>
- Puthiyedth, N., Riveros, C., Berretta, R., & Moscato, P. (2016). Identification of Differentially Expressed Genes through Integrated Study of Alzheimer's Disease Affected Brain Regions. *PLoS One*, 11(4), e0152342. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0152342>
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 362(4), 329–44. <http://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>
- Rao, J. S., Keleshian, V. L., Klein, S., & Rapoport, S. I. (2012). Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Translational Psychiatry*, 2(7), e132. <http://doi.org/10.1038/tp.2012.55>
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640–51. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>
- Remenyi, J., van den Bosch, M. W. M., Palygin, O., Mistry, R. B., McKenzie, C., Macdonald, A., ... Pankratov, Y. (2013a). miR-132/212 Knockout Mice Reveal Roles for These miRNAs in Regulating Cortical Synaptic Transmission and Plasticity. *PLoS One*, 8(4), e62509. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0062509>
- Remenyi, J., van den Bosch, M. W. M., Palygin, O., Mistry, R. B., McKenzie, C., Macdonald, A., ... Pankratov, Y. (2013b). miR-132/212 Knockout Mice Reveal Roles for These miRNAs in Regulating Cortical Synaptic Transmission and Plasticity. *PLoS One*, 8(4), e62509. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0062509>
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14(10A), 1902–10. <http://doi.org/10.1101/gr.2722704>
- Salta, E., Sierksma, A., Vanden Eynden, E., & De Strooper, B. (2016). miR-132 loss de-represses ITPKB and aggravates amyloid and TAU pathology in Alzheimer's brain. *EMBO Molecular Medicine*, 8(9), 1005–18. <http://doi.org/10.15252/emmm.201606520>
- Satoh, J. (2012). Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains. *Experimental Neurology*, 235(2), 436–46. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.003>
- Shaked, I., Meerson, A., Wolf, Y., Avni, R., Greenberg, D., Gilboa-Geffen, A., & Soreq, H. (2009). MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity*, 31(6), 965–73. <http://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.019>
- Shaltiel, G., Hanan, M., Wolf, Y., Barbash, S., Kovalev, E., Shoham, S., & Soreq, H. (2013). Hippocampal microRNA-132 mediates stress-inducible cognitive deficits through its acetylcholinesterase target. *Brain Structure & Function*, 218(1), 59–72. <http://doi.org/10.1007/s00429-011-0376-z>
- Smith, P. Y., Delay, C., Girard, J., Papon, M.-A., Planel, E., Sergeant, N., ... Hébert, S. S. (2011). MicroRNA-132 loss is associated with tau exon 10 inclusion in progressive supranuclear palsy. *Human Molecular Genetics*, 20(20), 4016–24. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddr330>
- Snow, W. M., & Albeni, B. C. (2016). Neuronal Gene Targets of NF-κB and Their Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9, 118. <http://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00118>
- Soreq, H., & Wolf, Y. (2011). NeurimmiRs: microRNAs in the neuroimmune interface. *Trends in Molecular Medicine*, 17(10), 548–55. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.06.009>
- Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurology*, 12(6), 609–22. [http://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70090-5](http://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70090-5)
- Strittmatter, W. J., Saunders, A. M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G. S., & Roses, A. D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 1977–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8446617>
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K. H., Mistl, C., Rothacher, S., ... Sommer, B. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 13287–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371838>
- Takata, K., Kitamura, Y., Tsuchiya, D., Kawasaki, T., Taniguchi, T., & Shimohama, S. (2004). High mobility group box protein-1 inhibits microglial Aβ clearance and enhances Aβ neurotoxicity. *Journal of Neuroscience Research*, 78(6), 880–91. <http://doi.org/10.1002/jnr.20340>
- Tanzi, R. E. (2012). The genetics of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10), 1–10.

- <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006296>
- Terai, K., Matsuo, A., & McGeer, P. L. (1996). *Enhancement of immunoreactivity for NF- κ B in the hippocampal formation and cerebral cortex of Alzheimer's disease*. *Brain Research* (Vol. 735).
- Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J., & Parker, R. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & Development*, 20(5), 515–524. <http://doi.org/10.1101/gad.1399806>
- Vorwerk, S., Ganter, K., Cheng, Y., Hoheisel, J., Stähler, P. F., & Beier, M. (2008). Microfluidic-based enzymatic on-chip labeling of miRNAs. *New Biotechnology*, 25(2–3), 142–149. <http://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.08.005>
- Wanet, A., Tachenay, A., Arnould, T., & Renard, P. (2012). miR-212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment. *Nucleic Acids Research*, 40(11), 4742–53. <http://doi.org/10.1093/nar/gks151>
- Wang, W.-X., Huang, Q., Hu, Y., Stromberg, A. J., & Nelson, P. T. (2011). Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex: white matter versus gray matter. *Acta Neuropathologica*, 121(2), 193–205. <http://doi.org/10.1007/s00401-010-0756-0>
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, 11(3), 228–234. <http://doi.org/10.1038/ncb0309-228>
- Wong, H.-K. A., Veremeyko, T., Patel, N., Lemere, C. A., Walsh, D. M., Esau, C., ... Krichevsky, A. M. (2013). De-repression of FOXO3a death axis by microRNA-132 and -212 causes neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, ddt164-. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt164>
- Yang, Y., Jin, Y., Martyn, A. C., Lin, P., Song, Y., Chen, F., ... Wang, A. (2013). Expression pattern implicates a potential role for human recruitment factor in the process of implantation in uteri and development of preimplantation embryos in mice. *The Journal of Reproduction and Development*, 59(3), 245–51. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3934142&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24), 3011–3016. <http://doi.org/10.1101/gad.1158803>
- Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, 4, 3. <http://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>
- Zou, Z., Liu, C., Che, C., & Huang, H. (2014). Clinical genetics of Alzheimer's disease. *BioMed Research International*, 2014, 291862. <http://doi.org/10.1155/2014/291862>

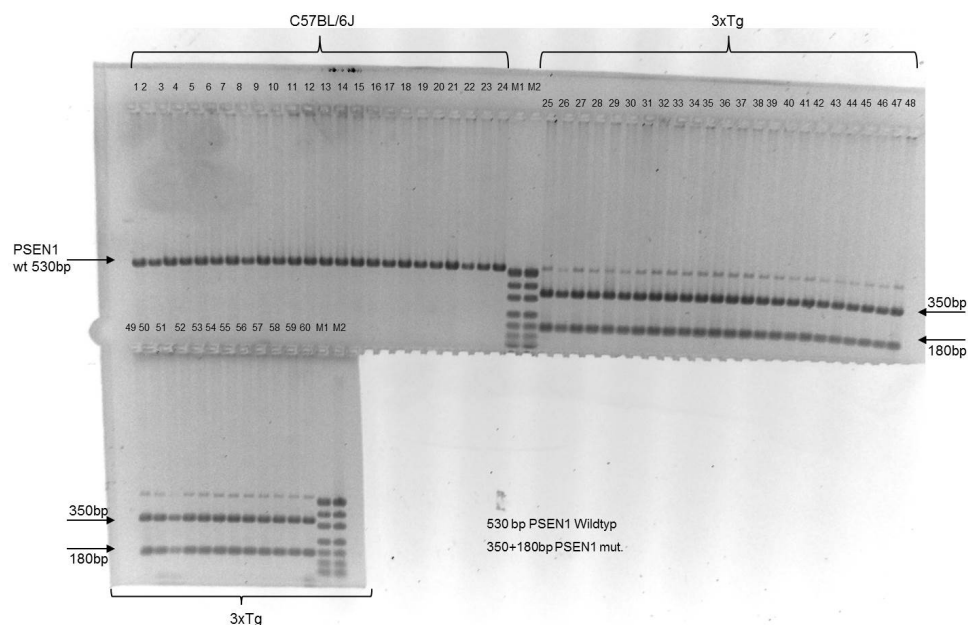
9. ANHANG

A1: Genotypisierung 3xTg und C57BL/6J

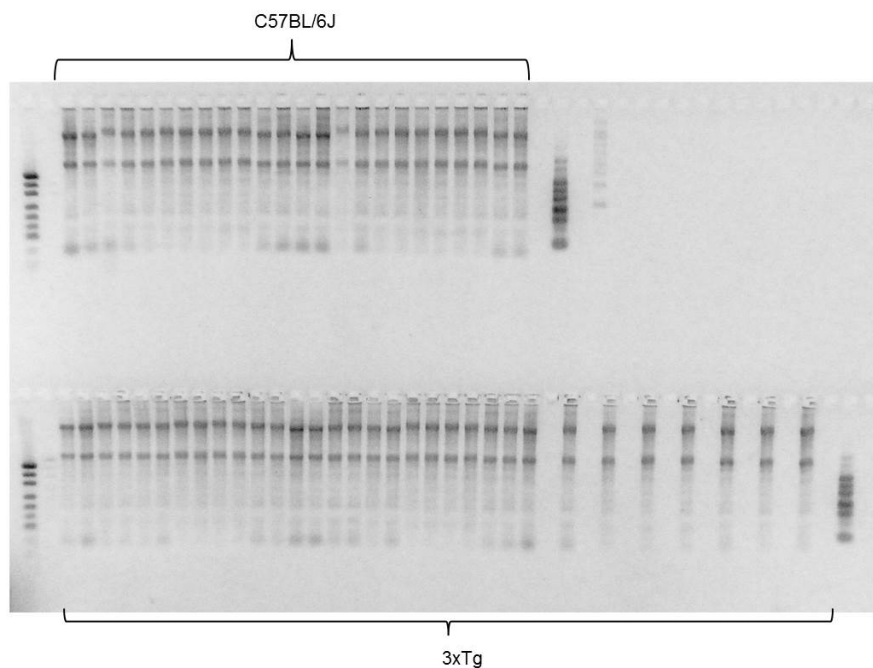
Zunächst wurde PSEN1 in einer PCR erfolgreich für für alle C57BL/6J (oberer Gelteil) und 3xTg (unterer Gelteil) amplifiziert. Das PCR-Produkt hat eine Fragmentgröße von 530 bp.



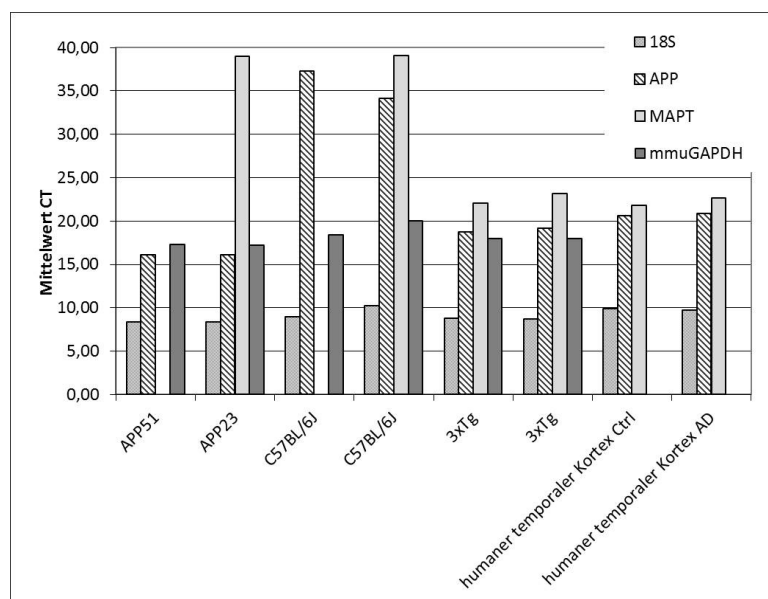
Anschließend wurde für alle Proben eine Restriktion mit BstI durchgeführt. 3xTg Mäuse tragen eine PSEN1 Mutation die das PSEN1 PCR Produkt in zwei Fragmente restringieren lässt während die Kontrollmäuse diese PSEN1 Mutation nicht tragen und somit keine Restriktionsfragmente entstehen.



Ergebnisse (CT-Werte) einer semiquantitativen real time PCR für humanes APP und MAPT in 3xTG, APP51, APP23, C57BL/6J, humaner temporaler Kortex AD und CTRL. Die nachfolgende Abbildung zeigt die Auftrennung von Gesamt-RNA für alle verwendeten Tiere. Es sind distinkte Banden für 28S RNA (obere Bande) und 18S RNA (untere Bande) zu erkennen, was für eine gute Qualität der RNA spricht.



Die Gesamt-RNA wurde exemplarisch für je zwei 3xTg und C57BL/6J Mäuse in einer semiquantitativen real time PCR auf Expression von humanem APP und MAPT im Vergleich zu Gesamt-RNA zweier weiterer Mausmodelle (APP51; APP23) sowie in humanem temporalen Kortex einer AD und einer Kontrollprobe analysiert. Das Ergebnis ist nachfolgend graphisch dargestellt. 3xTg Mäuse verhalten sich bezüglich der analysierten Genexpression ähnlich zu den humanen temporalen Kortizes. Die Kontrollmäuse exprimieren weder humanes APP noch humanes MAPT. APP23 und APP51 Mäuse zeigen erhöhte Expression für APP nicht aber für MAPT. Die Ergebnisse entsprechen im Allgemeinen den Erwartungen.



A2: 3'UTR Sequenz der reifen miRNA im FASTA Format für die Analyse mit RNAHybrid

Fett gedruckte Sequenzen entsprechen der vorhergesagten Bindestelle für hsa-miR-132-3p, die unterstrichenen Sequenzen entsprechen den vorhergesagten Bindestellen für hsa-miR-212-3p, welche von RNAHybrid als Hairpin Struktur dargestellt wird (VERWEIS Abbildung Struktur)

Homo sapiens nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (NFKB1), transcript variant 1, mRNA

>3'UTR for NFKB1 NM_003998.3 hg18_ensGene_ENST00000226574 range=chr4:103756798-103757506

5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

```
cctgctgacaattcccacacgtgtaaaccacccctaaattccactgcgtgtcca
caagacagaagctgaagtcacacaaaggtgctcagagagccggcccgctgaatcattc
tcgatttaactcgagacctttcaactggcttccttctggttcataaatgaatttta
gtttggttcacttacagatagtagcaatcacacactggctgagcggatgcattcg
gggatgaggtgcttactaagctttgccagctgctgctggatcacagctgctttctgttg
tcattgctgtgtccctctgctacgttcctattgcttaaaaggtatcacggtcgccacc
tggcattcctctgaccacagcatcatttgcattcaaattaagggttaagaaaagagat
attttaaataagagtcacttgatgtgccattttaaaaaaaaggcatattgcttttct
aatgtggttatttctgatttgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaataactgtcaatatt
taaacatggttacaatcattgctgaaaatggattttccccctttctgcatttgcatt
tgtaaatatgttttttagatcaaatactttaaggaaaaaatgttgattataaatgct
atttttattttactttataataaaaggaaaagcaaattgatgacctc
```

Homo sapiens protein kinase N2 (PKN2), mRNA

>3'UTR for PKN2 NM_006256.2 hg18_ensGene_ENST00000370521 range=chr1:89071720-89074526 5'pad=0

3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

```
gttgctagacactgcgaaccaagctgactcacaagaagacctcttaaaaatagcaacc
ttcatttgctctgtgccaccaatagcttctgagtttttgtgtgtgttttattg
aaacacgtgaagattgtttaaaagtaccattctaatacttctcaaaagtggctcctca
ttgacttcagcgtaaatagagcactggaaacagtttcatggagttaagttagtgaa
catcgccatgaaaatccatcacgaatacttttgatcaaatagctatttttaaaaagaa
agaaaaaaaccactttttatagtccttagctttgccatagcccgcttaagtgaagg
aaagttaactacttaactatgtttataaaaagaaaaagggttggaatgctattactg
ttcacaaaagtatgattctgttgaataaggcaaatgctcttttttaaaaaaaaga
cattactgtaatatcaaaaacgtggcagttgtatacaactcgggctgattttttt
```

aaaaaacagaatgaattgatgtcttattttataaatgttctatatttattaggagaaaa
 ctttataattgctttttatcaatcatgtaacaggcttagctttccaacagagctgct
 tgccaaacaatttttttatttaaacagtgtgaaacaacaggatcagcatttact
 taagatgttaagaatgaggacttttaacagccgaaccaagatattgttacctgtatgca
 ttcccaaagtctagatgctcagtagttcagtcatactttcagaatcagtgaccgatt
 acccttttttggtattcactctacatctgccaacctagttcaccttggtttgtgtctg
 ctgtagaagggaaccataacttggttaaccgtaggattatcattgtatacatgctgtg
 aacatgtatatgtgcaagtttaattgtattctatgtttaggcttattttaattttac
 cacttcactctttgtacagtgccaagcagacacctcaactccagcatttacattaa
 gtgcattgtacattttaggccactggatccagattttatattggcagttattgaggga
 aaagcaatatattgtaacagaatgtataaatattttgataaaacagtcataattttatt
 aaaaaatgaattataacactaaagctgtacctcaaaagtctcaaaaaataatttgatgaaa
 tattttatacaactcttcaaggatccgtctgtggctttttatactcttttagggtgtc
 tttttacaaacctgactttccactgctgtagttttttgtttgtttgtttgtttg
 attttataattttttctcctaactctatgactttattgtttttcttagtttagtaatagc
 atctttgatcctgtgcttagcatgttagggtcattatacctcaggaatagcaagctgtta
 agtaaccatactgaattaactatttaattacagtgaagctcatctcttaaaaattgttcag
 gtgtaaatcttatgagaacatgaaaaagcacactgatttatggagagttgagctaaaaa
 catttataaatatttgctgggatgttttagcatcttttcattgtactctgagaacaatta
 aaattgtccagagatcatttatattaccttccaaattgtttattaccaagatcctttgg
 gagaaaaatcttatagaatgggggaacaatatgtggtttaagttattttaaatgccagt
 taatttcctcggaaggacaatagaggaaacttagcttaattgtctggctttaatttaa
 ctgtgttaatacaacattaaaaataaaactaaatacttttgaggtagctgctcact
 tttttggttctcaaatagcaagaagtaattgtctaaaataggctcttagcattaaaaac
 tgacagcatttcgttaactacacagtgtagagaatttttttaattgaagcattcacta
 aaaaaattagaaggcagggtctatttacacaattaagctgaagaaagcactaatttttg
 tagtttaaaatataatatttttagtcagatttaaaatttaagctttatagagttaa
 atataattttgctattactgtatgtgtatgtgactgctcaagcatttgaagaaattag
 gatattttagaatggtacactatgcattcaaatgaaatgtgcctttcactatgtcattct
 aagaaaaaagtggtttttgagtcataaattatcacaaatgcacaaattaagtcata
 tagattgaaattgttaactttggttttaagtattctttccttttagaaacttcctaaga
 ttaaaatatacttttaacttttctgtgttcaaaatctcaaagactaatttaactttaaaa
 cattcttgcaagtactttttgctcctagtgaaggcttaaaacctgaacattcagagcaaa
 ctgtccacttcattgggaataatgggaaaagttgtattctgctcctgtaaggctcagtag
 catcttttattgaagcatatttatggactgctactgtgtatagatactgagaatagga
 agtttttttttaagcaacaaaatgttgatgaatgaagaacagcctgttttaattaag
 atgcaagcaccagattgtatgtacttttctgtttgaggttagcttattttaattta
 ggacctggcttctcaaaaaggcaaatgaataaaacagaatactagta

Homo sapiens CREB3 regulatory factor (CREBRF), transcript variant 1, mRNA

>3'UTR for C5ORF41 NM_153607.2hg18_ensGene_ENST00000296953 range=chr5:172493355-172496567
 5'pad=0 3'pad=0 strand=+ repeatMasking=none

tcagcctcattggaccactggcagaaatgtctgcgtttgtcacgttatccattgtaa
 ttttcattctgtttgcatgctagtagcattatgtaaacatttacaattaggttacatt
 gttttaagaactaagtagcataagtgaagcatgatccaaatacttgattattgcatttt
 cagagcataaacattgattaaaactgctactggcatcagaattgaaaatcatatgtttaa
 gtaaatgttaggtacagattacaaaaatctgttaaagcaaaacattttggaggagtga
 tagtaaaatgccagtagttgtggcagatttatgctctgaaccacacaaaaaattgagga
 agcatttttttaaacagtcggtttaaattgttttagaattattgcttttgttctaatt
 ttccacaaccattaatctcactgttatatggcacaccagcactgtgcctgtgggcat
 attagatgttcatgtcagagctcaagatgatataataatataatataatataatata
 atatacacacacacacacaaatgtctgtgcaagtaagaaaaaaaagcatattctttgtg
 cctgtattttggggaaactctaaaactggaatattttgtatgatgaaaaccctaaga
 gaaaaaacaagatatagatggaaaaattatggggttaaatgtttttgttccaact
 ctttttcagatttttgatgtatataggactatgtgaaatgtagatatatgccacaga



gtctgtgtattgtataaaaaacaaaacaaaaacaaaaaaagatggctctagaaaa
 ctcatatttcggtacttgaccggaagaagacaaatacttgacattattgcgattgtttt
 atttttgtaccaagacaaatgcaactgataggcaactgccagtctaagtaagttt
 tgcacagcttacatgatactgtatgaatgtatgaaaaaaaggagaaaaaaagaaaaa
 aaaggtcagggttagggatcttactgaactgtgaatttttttctgttgggtccaatta
 tctacagaaggagcatccatacacaataatttttctgttctctagtctgcttcc
 atagtagataagttgggtggccatttagatgtcttttatttctgacttatttaggaaat
 ttttaatatatttcattttagtaagctattgataaaatagttttgactttgaaaattaa
 atgtttatttagcttatttagtatacttccaccagacaacaaatagattttttatt
 gtattatgtatatatatatgtaaagaagaaaaagctaaaaatatctaattctttag
 ttgccattttccgattgtattattgtgcatgtaattttcaaagatcaacacagg
 ctaaaacaaaaacatttatagatttttatattttgtacaggtattttcaaactagctt
 cttcaaacttaacatgtgacttattcttctatagtttctagaattgagaacattaacac
 atttagtttttaggtgctctttttgtctatataaacagcttcattagtcagtgttta
 actgtgttcaagctttacctctgtgatgagaaatttcttatgtcaaggcagcattataaac
 cttccccacagatttttccatcctgtctcttactgttttattctcaaatctgtgct
 ttgaactctgaaaactgggtgcttaaaaactaaaaaagaaaaaagcatatttagcaag
 gaaaaaataccaaaaatttcaggcatagctgctggaaaaattatctatttccattac
 ccactgtaggatttctttttaattatactttagctataaagtgcaagataatttgt
 tcttttcttttactttgttaccctattgtaagctatagcatatgaagctatatatatag
 cttgtgaaggtttgatctagaacaccagtaacaaatgaacaatgttgcttaccctgctt
 ttgacatcttaaaaaagaaatccaaggaggattgtaaggattgtcttaccaccttagct
 gaactgtgatgcacaagatttttctatgtgtttgggtggaatgtacctgggtgtacatt
 cagctaaacagatgataagctcaagctgatgggttaatagaatgtaagttcatcggtt
 aaagcttttcttttaggttggaagggcaaacacaggcttgaagttggaagtatat
 gaagcttgacagagtggtctggttaattgaaaagtttcaaactatggcagtttgc
 aatcaggtgaaaatcacctcatgatattcagctgataaggttataaaattgcccttct
 tagctgctctgttaggaattctggttttgatacttttctctgctgcaaacagaatt
 tgatttttggcttgcatttcaaaaaaaaagacttgaatctgttttagtagattcca
 tatctttgagtttcagtggttttatgtactacttaagttaaatagttaaaagcttttaa
 atagttgagcttttaattgtgacactttattttgtacattttatatatgtatgtatat
 cttagaaaagcattttgttaaaaaaaatgcattttatatgattcctgccatttgctgc
 taaatctgggctggcagaatgtgcagcgatacttgatctatataaa**acctggcagta**
aaatgtagagtgaaagttaaatccttctgtgttttaactttatcataaagatgacatag
 gcaagctgtgcagctttacattttaaccaggggactctgtggcatttaaaaccgtctaga
 aatggttgactttaatgccagtaataatctgcttctctattgtcattaaaaatatac
 gtttagtgcacacaaaccaatcttataagggtaatgtaaaacccaacaattgtac
 atgttctgttttgaaaattgtggcatgtattttgggtgaagatcattagagaagagtt
 ctctaaaggttttctgttcatacatggtatacagatagctcataatgaagtcagaat
 cttacttttaagtgaaggcattgtgaattcacctcaagtaaacccattgttccaaagcaa
 ttataaactttgactctgactactatgattt

Homo sapiens glial fibrillary acidic protein (GFAP), transcript variant 1, mRNA

>3'UTR for GFAP NM_002055.4 hg18_ensGene_ENST00000253408 range=chr17:40338519-40340240 5'pad=0
 3'pad=0 strand=- repeatMasking=none

ggcaggaccacctgggtggcctctgccccgtctcatgaggggcccagcagaagcaggat
 agttgctccgctctgctggcacatttcccagacctgagctccccaccacccagctgc
 tccctcctcctctgtccctaggctgctgctcctaggctccgtcagtatcaggcc
 tgccagacggcaccacccagcaccagcaactccaactaacaagaaactacccccaag
 gggcagctctggaggggcatggccagcagcttgcgttagaatgaggaggaaggagagaagg
 ggaggagggggggggacactactacatgccctccacatccctgattcctgtgttatg
 gaaactgttgccagagatggaggttctctcgagtatctgggaactgtgctttgagttt
 cctcaggctgctggagggaaactgagactcagacaggaaagggaaggccccacagacaag
 gtagccctggccagaggctgttttcttttgggttttatgaggtgggatccctatg
 ctgcctaggctgaccttgaactcctgggctcaagcagctctaccacctcagcctcctgtg



tagctgggattatagattggagccaccatgccagctcagagggtgttctcctagactg
accctgatcagtctaagatgggtggggacgtcctgccacctggggcagtcacctgccag
atcccagaaggacctcctgagcgatgactcaagtgtctcagtcacctgagctgccatcc
agggatgccatctgtgggcacgctgtgggcaggtgggagcttgattctcagcacttgggg
gatctgtgtgtacgtggagaggatgaggtgctgggaggatagagggggctgcctgg
ccccagctgtgggtacagagaggtcaagcccaggaggactgcccgtgcagactggagg
ggacgctggtagagatggaggaggaggcaattgggatggcgctaggcatacaagtagggg
ttgtgggtgaccagtgcacttggcctctggattgtgggaattaaggaaagtgactcatcc
tcttgaagatgctgaacaggagagaaaagggatgtatccatgggggcaggcatgactt
tgtccatttctaaggcctcttcttctgtgtcataccaggccgccccagcctctgag
cccctgggactgctgcttctaaccagtaagccactgccacagcttgacctctcca
ccccatagtaccggctgcttttccctaagccaaggcctcttgcggtcccttcttactc
acacacaaaatgtaccagtagttaggtagtgccctattttacaattgtaaaactgagg
cacgagcaaagtgaagacactggctcatattctgcagcctggaggccgggtgctcaggg
ctgacacgtccacccagtgacccactctgctttgactgagcagactggtgagcagact
gggtggatctgtgccagagatgggactgggaggggccacttcagggttctcctctccc
tctaaggccgaagaagggtccttccctctcccaagacttggtgtccttccctccactc
cttctgccacctgctgctgctgctgctgctaatttcagggcactgctgctgccttag
tcgctgaggaaaaataagacaaatgctgcgccttcccag

FASTA Format der Sequenz der reifen miRNA laut miRBase zur Verwendung in der RNAHybrid Analyse:

>hsa-miR-132-3p

UAACAGUCUACAGCCAUGGUUCG

>hsa-miR-212-3p

UAACAGUCUCCAGUCACGGCC

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Bedeutung
A	
Abb.	Ab bildung
AD	Alzheimer's D isease (<i>engl.</i>)
APOE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein (<i>engl.</i>)
B	
bp	basepairs (<i>engl.</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	
ca.	circa
°C	Celsius
Chr.	Ch romosom
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CT	Computertomographie
D	
ddH₂O	doppelt deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleicacid (<i>engl.</i>)
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxyribonukleotriphosphat
ds	doppelsträngig
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition
E	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ehem.	ehemals
engl.	englisch
EOAD	early-onset Alzheimer's Disease (<i>engl.</i>)
EtOH	Ethanol
EuroCoDe	E uropean C ollaboration on D ementia (<i>engl.</i>)
F	
FC	pre-frontal cortex (<i>engl.</i>)
FCS	fetale calve serum (<i>engl.</i>)
for	f orward (<i>engl.</i>)
G	
g	G ramm
griech.	griechisch
H	
HEK	human embryonic kidney (<i>engl.</i>)
hsa	homo sapiens (<i>lat.</i>)
I	
ICD-10 GM	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, German Modification, 10th edition
K	
kb	Kilobasen
L	
l	L iter
lat.	lateinisch
LOAD	late-onset Alzheimer's Disease (<i>engl.</i>)
M	
M	M olar
m	M illi
mRNA	messenger R NA (<i>engl.</i>)
min	M inute
miR	microRNA
mmu	mus musculus (<i>lat.</i>)
MRT	M agnetresonanztomographie
μ	mikro
N	
n	n ano
NINCDS-ADRDA	N ational I nstitute of N eurological and C ommunicative D isorders and S troke- A lzheimer's D isease and R elated D isorders A ssociation
nt	N ucleotide (<i>engl.</i>)
O	
OD	optische D ichte
P	
PBS	Phosphate-buffered S aline (<i>engl.</i>)
PCR	Polymerase chain reaction (<i>engl.</i>)
pH	Potentia Hydrogenii
PSEN1 bzw. PSEN2	P resenilin1 bzw. P resenilin2
R	
rcf	R elative C entrifugal F orce (<i>engl.</i>)

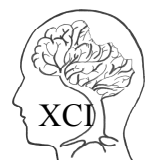


	rev	reverse (<i>engl.</i>)
	RIN	RNA Integrity Number (<i>engl.</i>)
	RNA	Ribonucleic acid (<i>engl.</i>)
	RNase	Ribonuclease
	RT	Reverse Transkription
	rpm	rounds per minute (<i>engl.</i>)
	rxn	Reaktion
S	SDS	Sodiumdodecylsulfat
	sek	Sekunde
	sq	semiquantitativ
	ss	single stranded (<i>engl.</i>)
	Std	Stunde
T	T_A	annealing temperature (<i>engl.</i>)
	Tab.	Tabelle
	TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
	TC	temporal cortex (<i>engl.</i>)
	TE	TRIS-EDTA-Puffer
	Tm	melting temperature (<i>engl.</i>)
U	U	Units
	u.a.	unter anderem
	u.ä.	und ähnliches
	UTR	untranslatierte Region
V	V	Volt
	v	Volumen
	v.a.	vor allem
W	w	weight (<i>engl.</i>)
Z	z.B.	zum Beispiel



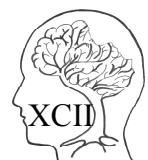
ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Anzahl der Todesfälle 2013 nach Todesursachen in Deutschland 2013 gemäß ICD-10	1
Abb. 2: Abhängigkeit von Prävalenz und Inzidenz von Alter und Geschlecht bei Demenz-Erkrankungen in Prozent	2
Abb. 3: Prozentuale Anteile der am häufigsten vorkommenden Demenzformen weltweit 2011	3
Abb. 4: Alois Alzheimer und Auguste Deter	3
Abb. 5: Graphische Darstellung der APP-Prozessierung über den nicht-amyloidogenen und amyloidogenen Weg (Querfurth & LaFerla, 2010)	5
Abb. 6: Biogenese von miRNAs(Winter, Jung, Keller, Gregory, & Diederichs, 2009).....	11
Abb. 7: Übersicht der Experimente und Analysen der vorliegenden Arbeit.....	13
Abb. 8: Bei Gelelektrophoresen verwendete Größenstandards der Firma Fermentas.....	17
Abb. 9: Plasmidkarten der verwendeten Plasmide	25
Abb. 10: Graphisch dargestellte Ergebnisse eines Bioanalyzer-Laufs.....	30
Abb. 11: Schematische Darstellung von Reverse Transkription und real time PCR miRNA TaqMan Assay.....	34
Abb. 12: Bestimmung des Ct-Wertes.	35
Abb. 13: Graphische Darstellung der MPEA-Technologie des febit miRNA Arrays.....	37
Abb. 14: Schematische Darstellung der mRNA Expressionsanalyse mittels HT12_v4 Mikroarray	39
Abb. 15: Experimentübersicht	45
Abb. 16: Verteilung der genomweiten miRNA Expression	47
Abb. 17: Graphische Darstellung der miR-132/212 Expressionslevels gegen Diagnose und Braak Stadien in temporalen Kortizes der MUC Kohorte.....	50
Abb. 18: Verteilung der mittels semiquantitativer real time PCR gemessenen miRNA Expressionswerte.....	52
Abb. 19: Logarithmierte Signalintensitäten neuronal exprimierter miRNAs über die Braak Stadien 0-VI.....	53
Abb. 20: Verteilung der mRNA Expressionslevels signifikant deregulierter Gene in Gehirngewebe von AD Patienten	56
Abb. 21: graphische Darstellung der Korrelation von GFAP sowie NFkB1 mit miR-132/212	61
Abb. 22: miRNA-mRNA-Strukturen mit der jeweils besten minimalen freien Energie (mfe)	62
Abb. 21: Verteilung der mittels semiquantitativer real time PCR gemessenen miR-132/212 Expressionswerte in zerebralem Kortex und Hippocampus von 3xTg und Kontrollmäusen	63
Abb. 22: Graphische Darstellung der dCT-Werte für miR-132 in 3xTg und Kontrollmäusen nach Alter.....	64
Abb. 23: Graphische Darstellung der miR-132/212 Expressionsänderung in HEK293T und SH-SY5Y Zellen nach Transfektion.....	65
Abb. 24: Sequenzen des miR-132/212 Clusters	LXVIII



TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: epidemiologische Daten zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben	21
Tab. 2: Detaillierte Informationen zu den Proben des MUC Validierungssets und NBB graue/weiße Substanz Set	22
Tab. 3: Tabellarische Übersicht zu Anzahl, Geschlecht und Alter der in der Studie verwendeten 3xTg und C57BL/6JMäusen	23
Tab. 4: Übersichtstabelle zu den durchgeführten RNA-Extraktionen.....	26
Tab. 5: Übersicht der Exzitations- und Emissionswellenlängen der zu analysierende Fluorophoren.....	44
Tab. 6: Korrelation der Expressionsdaten zwischen biologisch-technischen Replikaten.....	46
Tab. 7: Korrelation potentiell interessanter Kovariaten für die statistische Analyse der Expressionsdaten	47
Tab. 8: Im temporalen Kortex von AD Patienten deregulierte miRNAs.....	48
Tab. 9: Im temporalen Kortex von AD differentiell exprimierte Transkripte	54
Tab. 10: Schnittmenge deregulierter Gene aus der Literatur mit der vorliegenden Arbeit.....	57
Tab. 11: Schnittmenge der in der vorliegenden Arbeit identifizierten und in den Studien von Chandrasekaran <i>et al</i> 2016 und Puthiyedth <i>et al</i> 2016 beschriebenen, differentiell exprimierten Genen	58
Tab. 12: In der vorliegenden Studie identifizierte und in der Literatur validierte Zielgene des miR-132/212 Clusters	59
Tab. 13: Korrelation der genomweit signifikant deregulierten mRNAs mit hsa-miR-132-3p und hsa-miR-212-3p Expressionslevels aus temporalen Kortizes der MUC Kohorte.....	60



EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

(Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4)

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachfolgend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise geholfen:

Die Prozessierung der miRNA Expressionschips (febit) wurde von Dr. Petra Leidinger in der AG Messe durchgeführt.

Bei statistischen Berechnungen und bioinformatischen Fragestellungen wurde ich von Dr. Christian Spaniol, Dr. Wei Gu und Prof. Dr. Keller unterstützt.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere nach Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Ort, Datum

Unterschrift der Promovierenden

